



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Azcapotzalco

ESTUDIO TEÓRICO DE OSCILACIONES DE Ca^{2+} DE CELULAS ALFA

Tesis para obtener el grado de

Maestro en Ingeniería de Procesos

presentada por

Ing. Edgar Olivos Santes

Directoras de Tesis:

*Dra. Virginia González Vélez
Departamento Ciencias Básicas, UAM-A*

*Dra. Geneviève Dupont
Unidad de Cronobiología Teórica, ULB*

Azcapotzalco, 7 de julio del 2017.

Contenido

A. Ilustraciones	3
1. Antecedentes	4
1.1 Introducción.....	4
1.2. Estado del Arte.....	7
1.3. Justificación	8
1.4. Hipótesis	9
1.5. Objetivos	9
1.5.1. Objetivo General.....	9
1.5.2. Objetivos Particulares	9
2. Revisión de modelos	9
2.1 Modelos de Oscilaciones de ATP.	10
2.1.1 Modelo de Sel'kov.	10
2.2 Modelos de Oscilaciones de Ca^{2+}	17
2.2.1 Two-Pool Model.	17
2.3 Modelos de Actividad Eléctrica.....	20
2.3.1 Modelo de Chay-Keizer.....	20
2.3.2 Modelo de Diderichsen.....	23
3. Resultados	27
3.1 Construcción del modelo.....	27
3.2 Simulaciones.....	33
4. Conclusiones	43
5. Bibliografía	44

A. Ilustraciones

<i>Ilustración 1.- Diagrama del acople estímulo-secreción en célula beta.</i>	5
<i>Ilustración 2.- Propuesta del mecanismo acople estímulo-secreción para célula alfa (Quesada, et al., 2008).</i>	6
<i>Ilustración 3.- Sistema biológico estimulado por baja glucosa (célula alfa).</i>	6
<i>Ilustración 4.- Oscilaciones espontaneas de la concentración de Ca^{2+} en células alfa de ratón aisladas en un medio de baja glucosa. Estas oscilaciones son muy variables y resultado de la dependencia sincrónica e intermitente de la actividad eléctrica de la membrana plasmática (Quoix, et al., 2009).</i>	7
<i>Ilustración 5.- Tres primeras reacciones de la ruta glicolítica (Keener & Sneyd, 2009).</i>	10
<i>Ilustración 6.- Reacciones utilizadas para el modelo de Sel'kov.</i>	11
<i>Ilustración 7.- Dinámica de σ_1 y σ_2 con parámetros $v=0.0285, \eta=0.1, \alpha=1, \gamma=2$ (MATLAB).</i>	13
<i>Ilustración 8.- Plano Fase del modelo de Sel'kov con parámetros igual a Ilustración 2. (líneas punteadas en azul y rojo representan $(d\sigma_1)/dt=0$ y $(d\sigma_2)/dt=0$ respectivamente. (MATLAB).</i>	13
<i>Ilustración 9.- Diagrama de bifurcación del modelo de Sel'kov (XPPAUT).</i>	16
<i>Ilustración 10.- Esquema General del Two-Pool Model (Goldbeter, et al 1990).</i>	17
<i>Ilustración 11.- Diagrama de bifurcación Two-Pool Model. (En color azul y rojo se observan los valores máximos y mínimos de Ca^{2+} respectivamente alcanzados en la oscilación).</i>	18
<i>Ilustración 12.- Dinámicas de Ca^{2+} del Two-Pool Model a diferentes valores de β y los parámetros de la tabla 1 (MATLAB).</i>	19
<i>Ilustración 13.- Comportamiento de la actividad eléctrica y oscilaciones de calcio con los parametros de la Tabla 2.</i>	22
<i>Ilustración 14.- Estado estable del sistema cuando se disminuye el valor de g_{KATP}; Parametros de la Tabla 2, excepto $g_{\text{KATP}}=2$.</i>	23
<i>Ilustración 15.- Comportamiento del voltaje (abajo) en función del valor de g_{KATP} (arriba)(Wolfram Mathematica).</i>	25
<i>Ilustración 16.- Diagrama de bifurcación del modelo de Diderichsen que representa la dinámica del Voltaje en función del parámetro de bifurcación g_{KATP} (Wolfram Mathematica).</i>	26
<i>Ilustración 17.- Esquema por etapas para el desarrollo del proyecto.</i>	27
<i>Ilustración 18.- Dinámicas de Ca^{2+} con valores de β desde 0.001 hasta 0.005 (Wolfram Mathematica).</i>	29
<i>Ilustración 19.- Dinámicas de Ca^{2+} con valores de β desde 0.1 hasta 0.5 (Wolfram Mathematica).</i>	29
<i>Ilustración 20.- Diagrama de bifurcación de la dinámica de Ca^{2+} en función de la variable g_{KATP} (XPPAUT).</i>	31
<i>Ilustración 21.- Concentración de Ca^{2+} con valores de g_{KATP} desde 0.05 hasta 0.3 (Wolfram Mathematica).</i>	30
<i>Ilustración 22. Simulación del potencial de membrana (arriba) y el Ca^{2+} intracelular (abajo) cuando el Ca^{2+} promueve la síntesis de ATP.</i>	34
<i>Ilustración 23. Simulación de la concentración de ATP intracelular (arriba) y la conductancia de canales K_{ATP} (abajo) cuando el Ca^{2+} promueve la síntesis de ATP.</i>	35
<i>Ilustración 24. Simulación del potencial de membrana (arriba) y el Ca^{2+} intracelular (abajo) cuando el Ca^{2+} promueve el consumo de ATP.</i>	37
<i>Ilustración 25. Simulación de la concentración de ATP (arriba) y la conductancia de canales ATP (abajo) cuando el Ca^{2+} promueve el consumo de ATP.</i>	38
<i>Ilustración 26. Simulación de la fructosa bifosfato (FBP), representativa de las oscilaciones glicolíticas en el modelo de célula beta propuesto por (Bertram,2004) y del potencial de membrana (V), adecuando los parámetros marcados en rojo para representar una célula alfa.</i>	42

1. Antecedentes

1.1 Introducción

Las herramientas matemáticas utilizadas en la Ingeniería de Procesos se han aplicado ampliamente en procesos químicos y bioquímicos. Hoy en día se han logrado muchos avances a nivel celular gracias a tecnología que permite estudiar las células a mayor detalle (Spigelman, et al., 2010). El modelado y simulación de procesos nos sirven para entender de mejor manera nuestros sistemas de estudio, por ejemplo, los sistemas celulares que son sistemas muy complejos por lo cual es necesario abstraer información de ellos mediante diagramas, modelos matemáticos y la simulación de los mismos para compararlos con datos experimentales, este es un proceso iterativo que nos permite plantear hipótesis a partir del análisis de los modelos y validarlas, complementarlas o refutarlas con los resultados experimentales (Wolkenhauer, 2014). En este trabajo se hará uso de estas herramientas teóricas para estudiar las oscilaciones del ion calcio (Ca^{2+}) de células alfa pancreáticas.

El Ca^{2+} es de suma importancia en el cuerpo humano y es considerado el mayor señalizador celular que está presente en numerosos procesos celulares. En muchos procesos fisiológicos esenciales, el calcio intracelular actúa como mensajero retransmitiendo información dentro de las células para regular su actividad (Dupont, et al., 2007; Whitfield & Chakravarthy, 2001). Para llevar a cabo dichas señales, la concentración del Ca^{2+} dentro de la célula presenta variaciones (oscilaciones) que se regulan gracias a una maquinaria precisa, que consiste básicamente, en canales iónicos que permiten la entrada y salida del Ca^{2+} en la célula (Schwaller, 2012). A lo largo de este proyecto nos enfocaremos en el papel que desempeña este mensajero dentro de las células alfa.

Las células alfa se localizan en el páncreas, un órgano que realiza funciones vitales para los sistemas digestivo y endocrino. Dentro del páncreas, además de las células alfa, existen otros tipos de células (beta, delta) que se encuentran en diferentes proporciones dentro de almacenes llamados islotes de Langerhans. Las células alfa en conjunto con las células beta son las encargadas de mantener los niveles de glucosa en la sangre dentro de un rango normal, cualquier anomalía en el funcionamiento de estas células desencadena diversos tipos de enfermedades, una de ellas es la diabetes (Gromada, et al., 2007; Quesada, et al., 2008).

A pesar de que el trabajo de las células alfa y beta es conjunto, los mecanismos de cada uno de ellos son contrastantes. La célula alfa se estimula cuando la concentración de glucosa en la sangre es baja (hipoglicemia) y secreta una hormona llamada glucagón, encargada de elevar la concentración de la glucosa. Por otro lado la célula beta es estimulada a niveles altos de glucosa (hiperglicemia) y responde con la secreción de insulina, hormona que se encarga de reducir la concentración de glucosa. En ambos procesos entra en juego otro mensajero clave, el ATP (Adenosin Trifosfato), esta molécula es la principal fuente de energía a nivel celular y desempeña un papel importante en la

generación de oscilaciones de Ca^{2+} en muchos tipos celulares (Kummer, et al., 2005). A pesar de que se conocen ciertos roles del ATP en diversas células, la interacción entre Ca^{2+} y ATP aún no es del todo clara en células alfa. (Quesada, et al., 2008; Li, 2014).

El mecanismo que lleva a cabo la célula beta para liberar insulina ya se encuentra bien determinado, tal proceso puede resumirse en una serie de pasos en secuencia, que se describen a continuación: Entrada de glucosa a la célula, producción de ATP a partir del metabolismo de la glucosa, cierre de canales iónicos de K^+ sensibles al ATP (K_{ATP}), despolarización de la membrana, apertura de canales iónicos de Ca^{2+} (Estos 3 pasos son conocidos como la actividad eléctrica). Esta actividad permite la elevación del Ca^{2+} intracelular. Posteriormente los almacenes intracelulares juegan un rol importante para la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR), denominado así por sus siglas en inglés. El mecanismo CICR es paso clave para que se produzcan las oscilaciones que finalmente desencadenan la liberación de insulina de la célula (Ilustración 1). Este conjunto de pasos es conocido como acople estímulo-secreción en célula beta (Gylfe & Gilon, 2014; MacDonald & Rorsman, 2006; Wang & Thurmond, 2009).

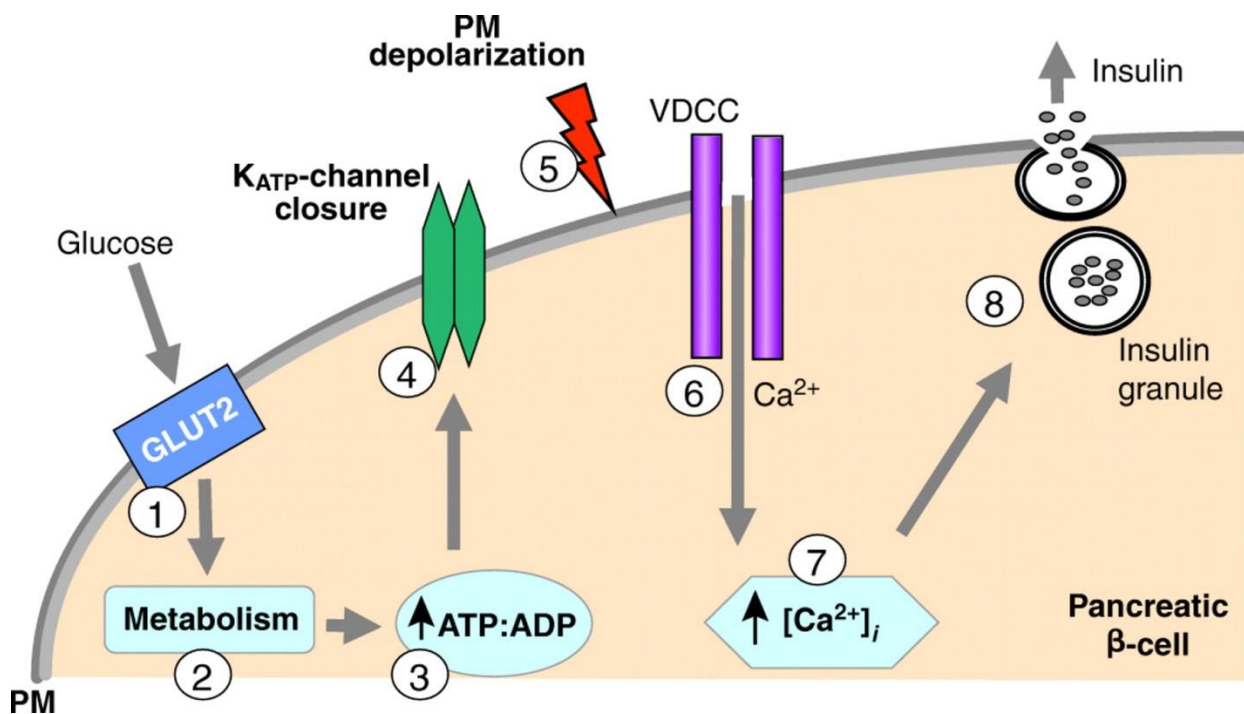


Ilustración 1.- Diagrama del acople estímulo-secreción en célula beta.

En el caso de las células alfa el acople estímulo secreción permanece aún sin entenderse en su totalidad, especialmente en el papel que juegan el ATP y los canales K_{ATP} en la generación de la actividad eléctrica, así como el mecanismo que controla las oscilaciones de Ca^{2+} . Al respecto algunos estudios han propuesto un acople en célula alfa similar al ocurrido en beta para tratar de explicar su comportamiento (Ilustración 2) (Quesada, et al., 2008; Rorsman, et al., 2014).

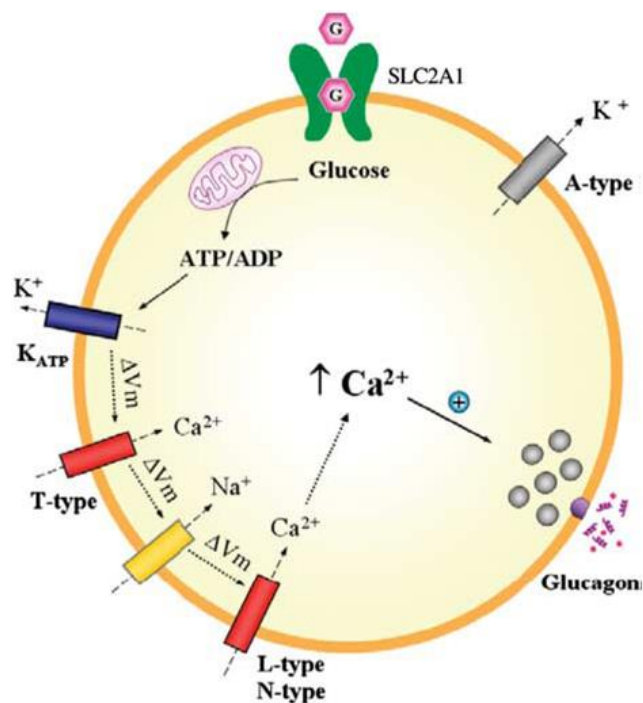


Ilustración 2.- Propuesta del mecanismo acople estímulo-secreción para célula alfa (Quesada, et al., 2008).

El enfoque de este trabajo es el de un problema de análisis de sistemas en el que se considera un sistema biológico estimulado por baja glucosa, el cual es una simplificación de la propuesta de acople estímulo-secreción de la célula alfa (Ilustración 3).

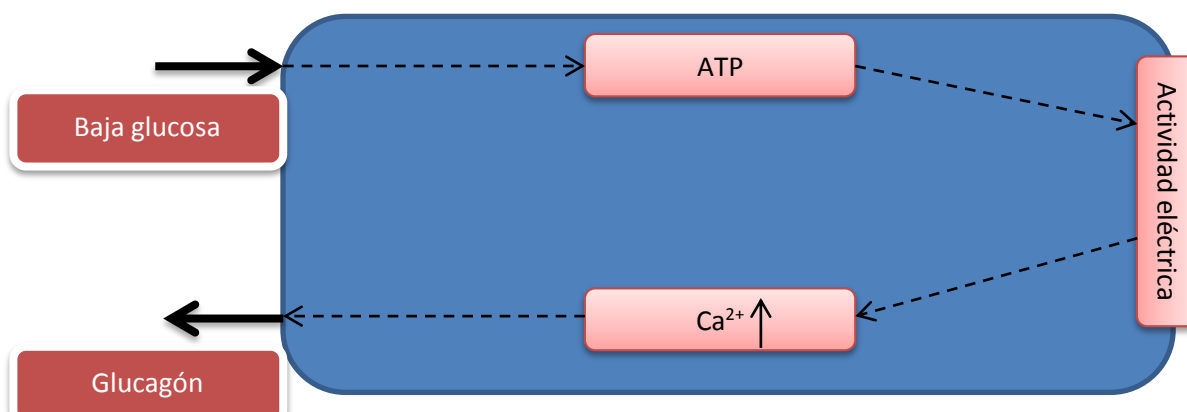


Ilustración 3.- Sistema biológico estimulado por baja glucosa (célula alfa).

El propósito de este estudio es que a partir del uso de herramientas teóricas de modelado matemático poder determinar la relación que existe entre el ATP, la actividad eléctrica y las oscilaciones de Ca^{2+} , comparando las oscilaciones de las simulaciones con las obtenidas experimentalmente. En la ilustración 4 se observan registros experimentales de una célula alfa aislada (Quoix, et al., 2009).

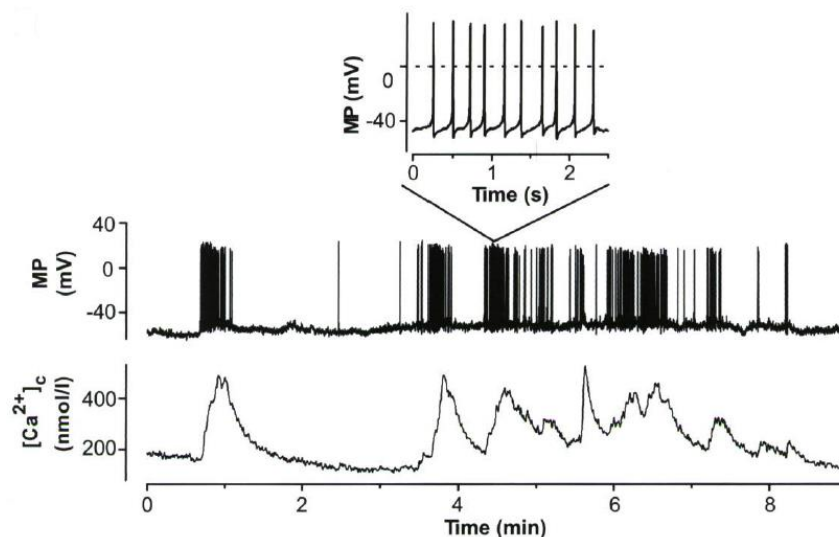


Ilustración 4.- Oscilaciones espontáneas de la concentración de Ca^{2+} en células alfa de ratón aisladas en un medio de baja glucosa. Estas oscilaciones son muy variables y resultado de la dependencia sincrónica e intermitente de la actividad eléctrica de la membrana plasmática (Quoix, et al., 2009).

1.2. Estado del Arte

El estudio de las oscilaciones de Ca^{2+} se ha multiplicado de manera notable desde sus primeras observaciones en los años 1985 y 1986 realizadas en oocitos y hepatocitos respectivamente (Goldbeter, 1996). Desde los primeros estudios se ha buscado la explicación del comportamiento oscilatorio y se le ha relacionado con la estimulación por agonistas, que son sustancias que se unen a los receptores celulares provocando alguna acción en la célula (Kummer, et al., 2000).

Uno de los primeros modelos matemáticos fue llevado a cabo por Albert Goldbeter et al. [1990], en el que se demostró que las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular se deben al aumento en concentración del inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y que posteriormente, el mismo Ca^{2+} desencadena un nuevo aumento en la concentración del Ca^{2+} citosólico (intracelular) originando el mecanismo de CICR. Este modelo logró explicar el comportamiento oscilatorio que se había observado experimentalmente en trabajos previos y mostró que es necesaria una acción conjunta de la entrada de calcio a la célula y el aumento del IP_3 para reproducir tales oscilaciones.

Para el modelado matemático de las oscilaciones de Ca^{2+} se han utilizado métodos determinísticos, basados en la resolución de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE's) que describen el sistema, y análisis estocástico o probabilístico basados en métodos matemáticos como Cadenas de Markov o Monte Carlo (Thul, 2014). Estos modelos han servido para reproducir el comportamiento de oscilaciones periódicas simples (spiking) así como describir la conducta oscilatoria de ráfaga (bursting) (Kummer, et al., 2005).

Se han realizado trabajos en células alfa y beta basados en datos experimentales, en los que se modela y se reproducen las características más importantes de la actividad eléctrica (Diderichsen & Göpel, 2006; Spigelman, et al., 2010; Sherman, 2010). En el modelo de Paul M. Diderichsen se incorporan las corrientes y conductancias de los principales canales iónicos y se analiza la relación que tienen con la secreción del glucagón. En este trabajo se validó la teoría de la dependencia de los canales K_{ATP} para la regulación de la actividad eléctrica en la célula alfa.

También se han reportado estudios de modelado que demuestran la relevancia y necesidad de las oscilaciones de Ca^{2+} para generar estímulos dentro de la célula, por ejemplo, la secreción, en el caso de la célula alfa (González-Velez, et al., 2012). Así como mecanismos fisiológicos de autorregulación en el que se activan almacenes que consumen y liberan Ca^{2+} promoviendo la oscilación (Dupont, et al., 2011).

Se han propuesto otros modelos en célula alfa para describir los mecanismos de regulación de la secreción de glucagón, considerando factores internos (endocrinos) y externos (paracrinos), por ejemplo el efecto que tienen la glucosa en la conductancia de los canales K_{ATP} o el papel que juega el Zinc en la apertura y cierre de los canales K_{ATP} (Fridlyand & Philipson, 2012; Watts & Sherman, 2014)

1.3. Justificación

Existe un problema a nivel mundial de sobrepeso y obesidad, que está muy ligado con la diabetes mellitus tipo 2. En países en vías de desarrollo, como México este problema está en aumento y presente desde niños hasta adultos (Ureña-Bogarín, et al., 2015). El papel que juega el islote de Langerhans es determinante en el desarrollo de esta enfermedad. La importancia del estudio de las células alfa radica en el papel que juegan en la regulación de glucosa en la sangre (Bergsten, 2014). A pesar de este vital trabajo que desempeñan, el conocimiento de esta célula es poco, ya que durante muchos años la mayoría de los estudios referentes a la diabetes se encaminaron hacia las células beta, por lo que aún queda mucho por descubrir en el campo de las células alfa. Algunas de las limitantes que se han presentado para el estudio de las células alfa son que se encuentran en menor proporción que las células beta dentro del islote de Langerhans, además de que las células alfa se ubican en su mayoría en la periferia de este islote, por lo que las técnicas utilizadas para su estudio dañan la membrana del islote pudiendo dañarlas. Aunado a la escasez de estudios experimentales, el estudio teórico de la célula y de su comportamiento

oscilatorio es mínimo. Por ello, este trabajo abordará tal aspecto, con el fin de aportar un mayor entendimiento de este proceso.

Una de las principales tareas de este proyecto es proponer un modelo matemático que relacione la concentración de ATP, la actividad eléctrica y las oscilaciones de Ca^{2+} , con el fin de analizar ciertas características del comportamiento de las oscilaciones simuladas en relación a las observadas en trabajos experimentales reportados; algunas características interesantes son la amplitud, frecuencia o Ca^{2+} acumulado.

1.4. Hipótesis

Es posible relacionar el comportamiento oscilatorio del Ca^{2+} intracelular observado en células alfa de páncreas estimuladas con baja glucosa, utilizando un modelo matemático que considere el mecanismo regulatorio del ATP y la actividad eléctrica.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo General

Analizar el comportamiento de las oscilaciones de Ca^{2+} observadas en células alfa, en relación con la dinámica de ATP, usando modelado matemático y análisis de bifurcación.

1.5.2. Objetivos Particulares

- Proponer un modelo matemático que permita estudiar la relación entre las dinámicas de ATP, de actividad eléctrica y de Ca^{2+} intracelular en células alfa.
- Estudiar la relación del Ca^{2+} intracelular con los procesos de síntesis y consumo de ATP.

2. Revisión de modelos

Como una primera etapa del trabajo se analizaron diversos modelos que describen comportamientos similares a la propuesta del acople estímulo-secreción para células alfa y sirven de punto de partida para plantear un modelo que relacione el nivel de ATP, la actividad eléctrica, y las oscilaciones de Ca^{2+} . Así mismo, el análisis de estos primeros trabajos permite describir el análisis de bifurcación el cual describe el comportamiento del sistema a partir de la variación de ciertos parámetros; esta es una de las principales herramientas teóricas utilizadas para el objetivo de nuestro trabajo.

2.1 Modelos de Oscilaciones de ATP.

2.1.1 Modelo de Sel'kov.

El primer modelo que se estudió para este trabajo fue desarrollado por Sel'kov en 1968 el cual logró explicar resultados experimentales que se habían observado en la glicólisis (Selkov, 1968).

Este modelo sólo plantea las primeras tres reacciones de la ruta glicolítica, en la que a partir de glucosa se obtiene fructosa 1,6 bisP. Para esto se llevan a cabo 2 reacciones de fosforilación y una más de isomerización. En la Ilustración 5 se observa esquemáticamente las reacciones implicadas.

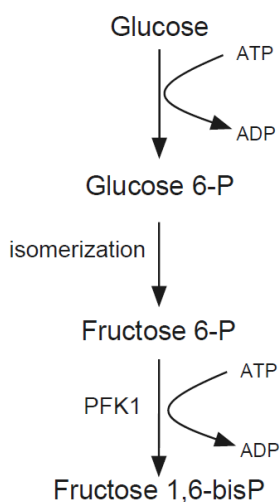


Ilustración 5.- Tres primeras reacciones de la ruta glicolítica (Keener & Sneyd, 2009).

Al final del esquema se muestra una reacción enzimática, la cual es catalizada por la fosfofructocinasa (PFK1). Para llevar a cabo estas reacciones es necesaria una gran cantidad de energía, la cual es proporcionada por el ATP cuando "dona" uno de sus iones fosfato, formándose así el ADP. La interacción entre ATP y ADP con la enzima PFK1 es la base del modelo, ya que las reacciones son inhibidas o promovidas de acuerdo a los diferentes estados del catalizador.

Las reacciones consideradas para el modelo de Sel'kov se resumen en la Ilustración 6.

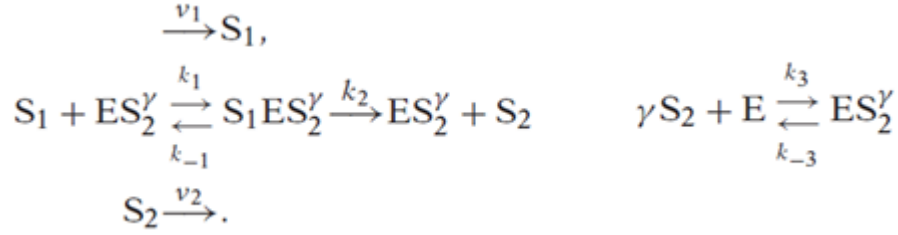


Ilustración 6.- Reacciones utilizadas para el modelo de Sel'kov.

Donde la variable S_1 representa al ATP, S_2 al ADP y PFK1 esta denotado por E. Se considera que el ATP está siendo suministrado por alguna fuente a velocidad v_1 y el ADP es removido a velocidad v_2 . En un inicio la enzima (E) está inactiva hasta que se combina con ADP formando el producto ES_2^γ . Después este complejo se combina con ATP formando $S_1ES_2^\gamma$

Considerando $s_1 = [S_1]$, $s_2 = [S_2]$, $e = [E]$, $x_1 = [ES_2^\gamma]$ y $x_2 = [S_1ES_2^\gamma]$, las reacciones se pueden reescribir en el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\begin{aligned}
 \frac{ds_1}{dt} &= v_1 - k_1 s_1 x_1 + k_{-1} x_2 \\
 \frac{ds_2}{dt} &= k_2 x_2 - \gamma k_3 s_2^\gamma e + \gamma k_{-3} x_1 - v_2 s_2 \\
 \frac{dx_1}{dt} &= -k_1 s_1 x_1 + (k_{-1} + k_2) x_2 + k_3 s_2^\gamma e - k_{-3} x_1 \\
 \frac{dx_2}{dt} &= k_1 s_1 x_1 - (k_{-1} + k_2) x_2
 \end{aligned}$$

Como siguiente paso se adimensionalizan las ecuaciones introduciendo las siguientes variables adimensionales $\sigma_1 = \frac{k_1 s_1}{k_2 + k_{-1}}$, $\sigma_2 = \left(\frac{k_3}{k_{-3}}\right)^{1/\gamma} s_2$, $u_1 = x_1/e_0$,

$u_2 = x_2/e_0$ y $t = \frac{k_2 + k_{-1}}{e_0 k_1 k_2} \tau$ quedando de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
 \frac{d\sigma_1}{d\tau} &= v - \frac{k_2 + k_{-1}}{k_2} u_1 \sigma_1 + \frac{k_{-1}}{k_2} u_2 \\
 \frac{d\sigma_2}{d\tau} &= \alpha \left[u_2 - \frac{\gamma k_{-3}}{k_2} \sigma_2^\gamma (1 - u_1 - u_2) + \frac{\gamma k_{-3}}{k_2} u_1 \right] - \eta \sigma_2 \\
 \epsilon \frac{du_1}{d\tau} &= u_2 - \sigma_1 u_1 + \frac{k_{-3}}{k_2 + k_{-1}} [\sigma_2^\gamma (1 - u_1 - u_2) - u_1] \\
 \epsilon \frac{du_2}{d\tau} &= \sigma_1 u_1 - u_2
 \end{aligned}$$

Donde $\epsilon = \frac{e_0 k_1 k_2}{(k_2 + k_{-1})^2}$, $v = \frac{v_1}{k_2 e_0}$, $\eta = \frac{v_2 (k_2 + k_{-1})}{k_1 k_2 e_0}$, $\alpha = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \left(\frac{k_3}{k_{-3}}\right)^{1/\gamma}$

Dado que el valor de ϵ es muy pequeño u_1 y u_2 se ajustan a valores cuasi-estacionarios, obteniendo:

$$u_1 = \frac{\sigma_2^\gamma}{\sigma_2^\gamma \sigma_1 + \sigma_2^\gamma + 1}$$

$$u_2 = \frac{\sigma_1 \sigma_2^\gamma}{\sigma_2^\gamma \sigma_1 + \sigma_2^\gamma + 1} = f(\sigma_1, \sigma_2)$$

Con estos valores cuasi-estacionarios finalmente obtenemos las dinámicas de σ_1 y σ_2

$$\frac{d\sigma_1}{d\tau} = v - f(\sigma_1, \sigma_2)$$

$$\frac{d\sigma_2}{d\tau} = \alpha f(\sigma_1, \sigma_2) - \eta \sigma_2$$

Como primer paso de análisis se calcula el valor de σ_1 en el estado estacionario. Es decir cuando $\frac{d\sigma_1}{d\tau} = 0$ y $\frac{d\sigma_2}{d\tau} = 0$. Para el caso de la primera ecuación tenemos:

$$0 = v - \frac{\sigma_1 \sigma_2^\gamma}{\sigma_2^\gamma \sigma_1 + \sigma_2^\gamma + 1}$$

$$\sigma_1 = \frac{v(\sigma_2^\gamma + 1)}{\sigma_2^\gamma(1 - v)}$$

Y para la segunda ecuación:

$$0 = \alpha \left(\frac{\sigma_1 \sigma_2^\gamma}{\sigma_2^\gamma \sigma_1 + \sigma_2^\gamma + 1} \right) - \eta \sigma_2$$

$$\sigma_1 = \frac{\frac{\eta}{\alpha}(\sigma_2^\gamma + 1)}{\left(\sigma_2^{\gamma-1} - \frac{\eta}{\alpha} \sigma_2^\gamma \right)}$$

Iguando ambos valores de σ_1 obtenemos

$$\frac{\frac{\eta}{\alpha}(\sigma_2^\gamma + 1)}{\left(\sigma_2^{\gamma-1} - \frac{\eta}{\alpha} \sigma_2^\gamma \right)} = \frac{v(\sigma_2^\gamma + 1)}{\sigma_2^\gamma(1 - v)}$$

$$\sigma_2 = \frac{\alpha}{\eta} v$$

Entonces tenemos una única solución en el estado estacionario que está dada por:

$$\sigma_1 = \frac{v(\sigma_2^\gamma + 1)}{\sigma_2^\gamma(1 - v)}$$

$$\sigma_2 = \frac{\alpha}{\eta} \nu$$

Si asignamos valores a los parámetros $\nu = 0.0285$, $\eta = 0.1$, $\alpha = 1$, $\gamma = 2$ y resolviendo el sistema de ecuaciones utilizando la función ODE45 (Runge-Kutta 4º orden) del software MATLAB se obtienen las dinámicas de σ_1 y σ_2 y un plano fase como se muestra en las siguientes ilustraciones:

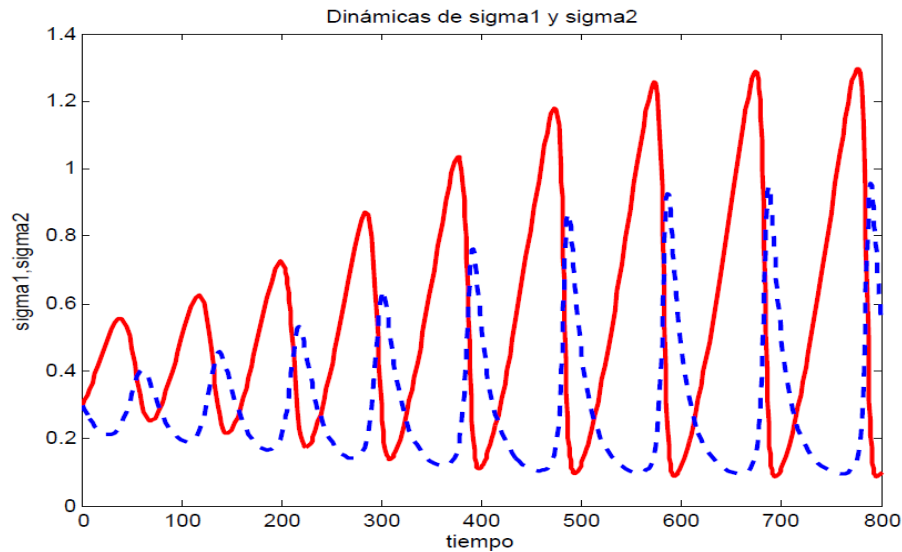


Ilustración 7.- Dinámica de σ_1 y σ_2 con parámetros $\nu=0.0285$, $\eta=0.1$, $\alpha=1$, $\gamma=2$ (MATLAB).

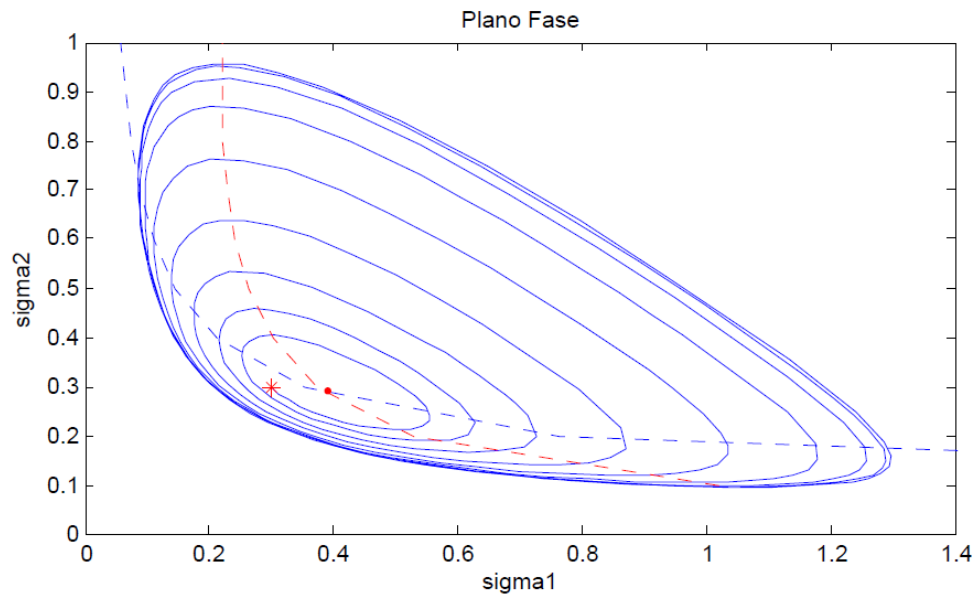


Ilustración 8.- Plano Fase del modelo de Sel'kov con parámetros igual a Ilustración 2. (líneas punteadas en azul y rojo representan $(d\sigma_1)/dt=0$ y $(d\sigma_2)/dt=0$ respectivamente. (MATLAB).

Para conocer la estabilidad del estado estacionario encontrado es necesario linealizar las ecuaciones diferenciales y encontrar los valores propios del nuevo sistema. Primero buscamos la matriz Jacobiana para el estado estacionario de nuestro sistema de ecuaciones:

$$\frac{d\sigma_1}{d\tau} = v - f(\sigma_1, \sigma_2) = F(\sigma_1, \sigma_2)$$

$$\frac{d\sigma_2}{d\tau} = \alpha f(\sigma_1, \sigma_2) - \eta \sigma_2 = G(\sigma_1, \sigma_2)$$

La matriz Jacobiana está dada por:

$$J = \begin{bmatrix} \frac{dF(\sigma_1, \sigma_2)}{d\sigma_1} & \frac{dF(\sigma_1, \sigma_2)}{d\sigma_2} \\ \frac{dG(\sigma_1, \sigma_2)}{d\sigma_1} & \frac{dG(\sigma_1, \sigma_2)}{d\sigma_2} \end{bmatrix}$$

Es necesario calcular las derivadas de F y G respecto a σ_1 y σ_2

$$\frac{dF(\sigma_1, \sigma_2)}{d\sigma_1} = -\frac{df(\sigma_1, \sigma_2)}{d\sigma_1} = -f_1$$

$$\frac{dF(\sigma_1, \sigma_2)}{d\sigma_2} = -\frac{df(\sigma_1, \sigma_2)}{d\sigma_2} = -f_2$$

$$\frac{dG(\sigma_1, \sigma_2)}{d\sigma_1} = \alpha f_1$$

$$\frac{dG(\sigma_1, \sigma_2)}{d\sigma_2} = \alpha f_2 - \eta$$

El nuevo sistema de ecuaciones para desviaciones del estado estacionario ($\tilde{\sigma}_1, \tilde{\sigma}_2$) está dado por:

$$\frac{d\tilde{\sigma}_1}{d\tau} = -f_1 \tilde{\sigma}_1 - f_2 \tilde{\sigma}_2$$

$$\frac{d\tilde{\sigma}_2}{d\tau} = \alpha f_1 \tilde{\sigma}_1 + (\alpha f_2 - \eta) \tilde{\sigma}_2$$

Para calcular los valores propios (λ) del sistema consideramos la siguiente modificación de la matriz Jacobiana:

$$\begin{bmatrix} \frac{dF(\sigma_1, \sigma_2)}{d\sigma_1} - \lambda & \frac{dF(\sigma_1, \sigma_2)}{d\sigma_2} \\ \frac{dG(\sigma_1, \sigma_2)}{d\sigma_1} & \frac{dG(\sigma_1, \sigma_2)}{d\sigma_2} - \lambda \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -f_1 - \lambda & -f_2 \\ \alpha f_1 & \alpha f_2 - \eta - \lambda \end{bmatrix}$$

Se evalúa el determinante de dicha matriz y se iguala a 0 para obtener la ecuación característica del sistema.

$$\begin{vmatrix} -f_1 - \lambda & -f_2 \\ \alpha f_1 & \alpha f_2 - \eta - \lambda \end{vmatrix} = 0$$

$$(-f_1 - \lambda)(\alpha f_2 - \eta - \lambda) - (-f_2 \alpha f_1) = 0$$

$$\lambda^2 - (-f_1 + \alpha f_2 - \eta)\lambda + f_1 \eta = 0$$

Desarrollando los términos de f_1 y f_2 tenemos:

$$f_1 = \frac{df(\sigma_1, \sigma_2)}{d\sigma_1} = \frac{d}{d\sigma_1} \left(\frac{\sigma_1 \sigma_2^\gamma}{\sigma_2^\gamma \sigma_1 + \sigma_2^\gamma + 1} \right)$$

$$f_2 = \frac{df(\sigma_1, \sigma_2)}{d\sigma_2} = \frac{d}{d\sigma_2} \left(\frac{\sigma_1 \sigma_2^\gamma}{\sigma_2^\gamma \sigma_1 + \sigma_2^\gamma + 1} \right)$$

$$f_1 = \frac{(\sigma_2^\gamma + 1)\sigma_2^\gamma}{(\sigma_2^\gamma \sigma_1 + \sigma_2^\gamma + 1)^2}$$

$$f_2 = \frac{\gamma \sigma_1 \sigma_2^{2\gamma-1}}{(\sigma_2^\gamma \sigma_1 + \sigma_2^\gamma + 1)^2}$$

Dado que tanto f_1 como f_2 siempre toman valores positivos el término $f_1 \eta$ también será positivo. Por lo tanto el término $H = -f_1 + \alpha f_2 - \eta$ es quien determina la estabilidad del sistema. Si H tiene signo positivo el sistema es inestable y se vuelve estable cuando H tiene signo negativo. El cambio de estable a inestable se da en el punto cuando $H=0$ y a este punto se le llama punto de bifurcación.

Sustituyendo f_1 y f_2 en H :

$$H = f_1 - \alpha f_2 + \eta$$

$$H = \frac{(\sigma_2^\gamma + 1)\sigma_2^\gamma}{(\sigma_2^\gamma \sigma_1 + \sigma_2^\gamma + 1)^2} - \alpha \left(\frac{\gamma \sigma_1 \sigma_2^{2\gamma-1}}{(\sigma_2^\gamma \sigma_1 + \sigma_2^\gamma + 1)^2} \right) + \eta$$

Evaluando con los valores de σ_1 y σ_2 en el estado estacionario:

$$H = \frac{\left(\left(\frac{\alpha v}{\eta} \right)^\gamma + 1 \right) \left(\frac{\alpha v}{\eta} \right)^\gamma}{\left(\left(\frac{\alpha v}{\eta} \right)^\gamma \sigma_1 + \left(\frac{\alpha v}{\eta} \right)^\gamma + 1 \right)^2} - \alpha \left(\frac{\gamma \sigma_1 \left(\frac{\alpha v}{\eta} \right)^{2\gamma-1}}{\left(\left(\frac{\alpha v}{\eta} \right)^\gamma \sigma_1 + \left(\frac{\alpha v}{\eta} \right)^\gamma + 1 \right)^2} \right) + \eta$$

Si $\frac{\alpha}{\eta} = p$ tenemos:

$$H = \frac{((pv)^\gamma + 1)(pv)^\gamma}{((pv)^\gamma \sigma_1 + (pv)^\gamma + 1)^2} - \alpha \left(\frac{\gamma \sigma_1 (pv)^{2\gamma-1}}{((pv)^\gamma \sigma_1 + (pv)^\gamma + 1)^2} \right) + \eta$$

$$H = \frac{1 - v}{1 + (pv)^\gamma} (\eta \gamma + (v - 1)(pv)^\gamma) - \eta$$

Si $\nu = 0$

$$H = \eta(\gamma - 1)$$

Dado que $\gamma > 1$ el signo de H cuando $\nu = 0$ es positivo. Por lo tanto el sistema es inestable

Si $\nu = 1$

$$H = -\eta$$

Ahora el signo de H es negativo. En este punto el sistema es estable.

Es claro que variando el valor de ν entre 0 y 1 puede cambiar la estabilidad del sistema. Cuando un parámetro logra este cambio en el comportamiento cualitativo de un sistema se le conoce como parámetro de bifurcación.

Para observar el momento en el que se da el cambio en el comportamiento del sistema se realizó un diagrama de bifurcación (Ilustración 9) con ayuda del software XPPAUT. En el que se grafican los cambios de la variable σ_1 respecto al valor del parámetro de bifurcación ν .

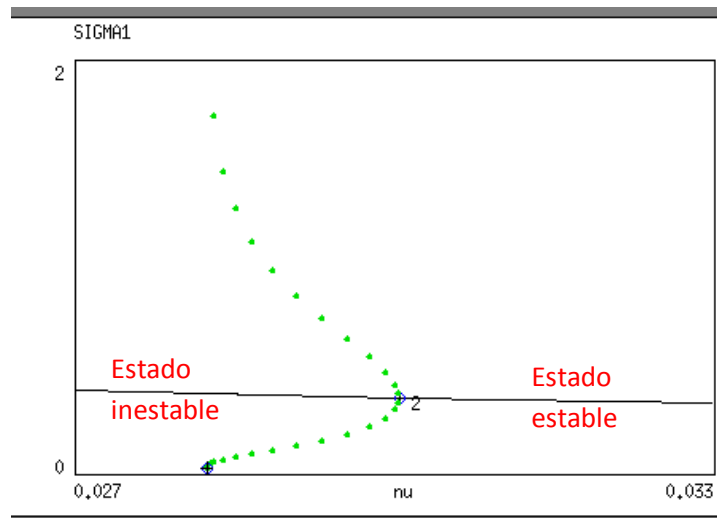


Ilustración 9.- Diagrama de bifurcación del modelo de Sel'kov (XPPAUT).

2.2 Modelos de Oscilaciones de Ca^{2+}

2.2.1 Two-Pool Model.

El segundo modelo que sirve de base para este trabajo es el desarrollado por Goldbeter y colaboradores [1990]. En este trabajo se estudia la dinámica del Ca^{2+} dentro de una célula que contiene 2 almacenes de este ión, uno sensible a un estímulo externo (IP_3) y el otro sensible a la concentración de Ca^{2+} en el interior de la célula. Cuando se presenta el estímulo por parte del IP_3 , el primer almacén libera el Ca^{2+} contenido el cual provoca un aumento de la concentración en el interior de la célula promoviendo la liberación de más Ca^{2+} , pero ahora realizado por el segundo almacén. A este mecanismo se le conoce como liberación de calcio inducida por calcio o CICR por sus siglas en inglés. El esquema que describe este sistema se muestra en la Ilustración 10.

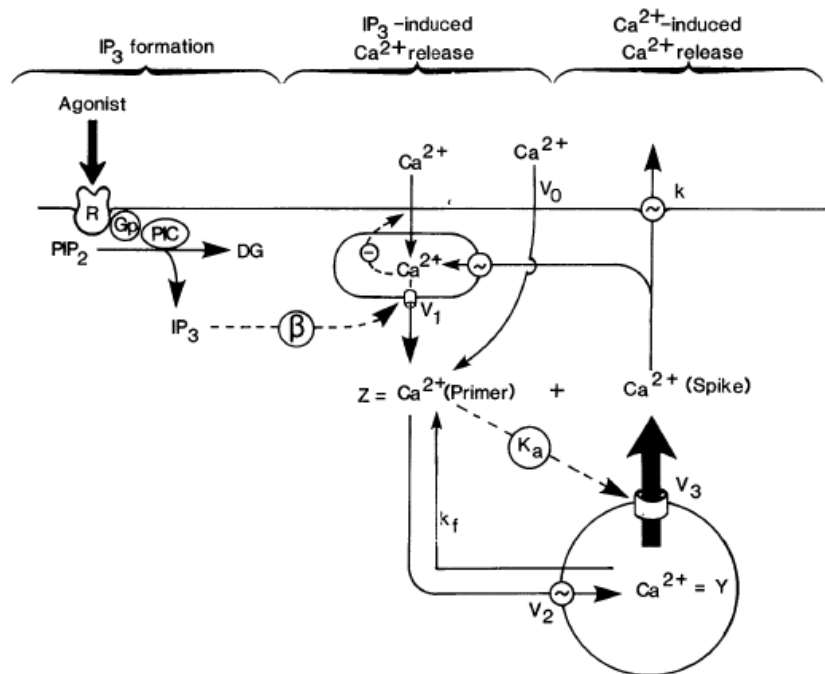


Ilustración 10.- Esquema General del Two-Pool Model (Goldbeter, et al 1990).

En este modelo se analizó la importancia del nivel de estimulación por parte del IP_3 para producir las oscilaciones de Ca^{2+} del sistema y esta denotada en las ecuaciones con el parámetro β . Se establecen como variables la concentración de Ca^{2+} en el interior de la célula (Ca^{2+} citosólico) que está representado por la letra Z y la concentración de Ca^{2+} en el interior del almacén sensible al Ca^{2+} representada con la letra Y .

Las ecuaciones que describen este modelo son las siguientes:

$$\frac{dZ}{dt} = v_0 + \beta v_1 - v_2 + v_3 + k_f Y - kZ$$

$$\frac{dY}{dt} = v_2 - v_3 - k_f Y$$

En donde V_0 y kZ representan el flujo de entrada y salida de Ca^{2+} al interior o exterior de la célula respectivamente. v_2 y v_3 representan el flujo de entrada y salida de Ca^{2+} al interior o exterior del almacén sensible a Ca^{2+} y el término $k_f Y$ representa una fuga del interior del mismo almacén hacia el interior celular.

Los valores de v_2 y v_3 están determinados por las siguientes ecuaciones:

$$v_2 = V_{M2} \frac{Z^n}{K_2^n + Z^n}$$

$$v_3 = V_{M3} \frac{Y^m}{K_R^m + Y^m} \cdot \frac{Z^p}{K_A^p + Z^p}$$

Este sistema de ecuaciones presenta un único estado estacionario. Realizando el análisis de estabilidad lineal se observa que el sistema tiene cambios en la estabilidad cuando se varía el parámetro β .

Llevando a cabo un diagrama de bifurcación realizado en el software XPPAUT (Ilustración 11), observamos el comportamiento de la variable Z respecto a la variación del parámetro β en las diferentes regiones de estabilidad del sistema.

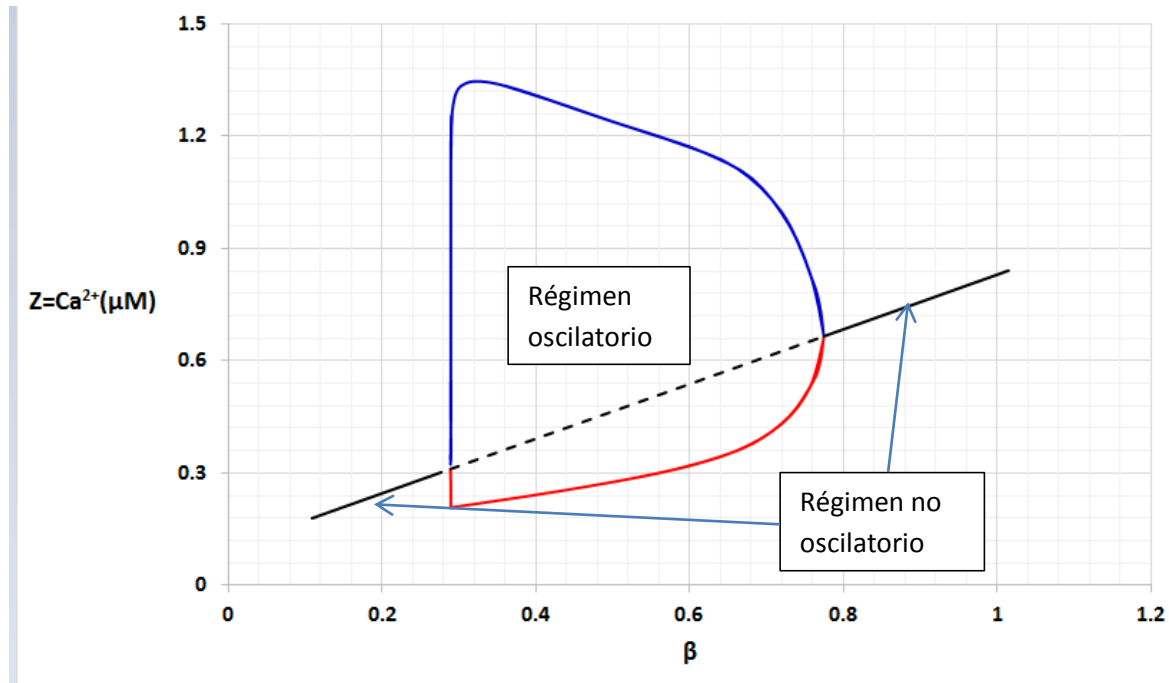


Ilustración 11.- Diagrama de bifurcación Two-Pool Model. (En color azul y rojo se observan los valores máximos y mínimos de Ca^{2+} respectivamente alcanzados en la oscilación).

Finalmente se implementó el modelo en el software MATLAB y se realizaron pruebas de simulación con la función ODE 45 considerando los parámetros de la Tabla 1 y diferentes valores del parámetro de bifurcación. En la Ilustración 12 se muestran algunos de los resultados obtenidos donde se observa el comportamiento del Ca^{2+} en los diferentes estados del sistema.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
v_0	1 ($\mu\text{M}/\text{s}$)	K_2	1 μM
k	10 (1/s)	K_R	2 μM
k_f	1 (1/s)	K_A	0.9 μM
v_1	7.3 ($\mu\text{M}/\text{s}$)	M	2
V_{M2}	65 ($\mu\text{M}/\text{s}$)	N	2
V_{M3}	500 ($\mu\text{M}/\text{s}$)	P	4

Tabla 1.- Parametros utilizados para el Two-Pool Model

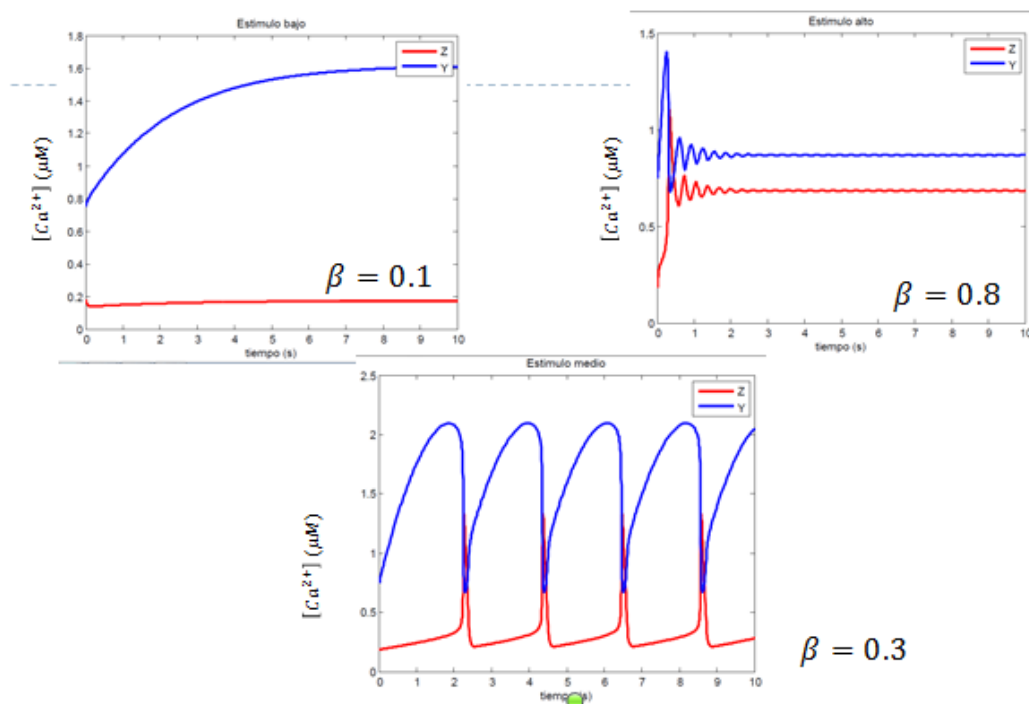


Ilustración 12.- Dinámicas de Ca^{2+} del Two-Pool Model a diferentes valores de β y los parámetros de la tabla 1 (MATLAB).

2.3 Modelos de Actividad Eléctrica

2.3.1 Modelo de Chay-Keizer.

El siguiente modelo de nuestro caso de estudio fue desarrollado por Chay y Keizer [1983] para reproducir las ráfagas (burst) observadas en las oscilaciones de voltaje de células beta. El modelo muestra el papel que juega la concentración de Ca^{2+} en el interior de la célula para desencadenar la actividad eléctrica (Chay & Keizer, 1983).

Las consideraciones para formular el modelo son las siguientes:

- 1) Canal de K^+ activado por Ca^{2+} . La conductancia del canal está en función del Ca^{2+} intracelular de la siguiente manera:

$$g_{KCa} = \bar{g}_{KCa} \frac{c}{Kd + c}$$

Donde \bar{g}_{KCa} es el valor de la conductancia máxima del canal.

- 2) Canal de K^+ activado por voltaje. Cuya conductancia está dada por:

$$g_K = \bar{g}_K n^4$$

El valor de n está determinado por la siguiente ecuación diferencial.

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1 - n) - \beta_n n$$

La corriente iónica debida a los canales de K^+ es:

$$I_K = (g_{KCa} + g_K)(V - V_K)$$

- 3) Canal de Ca^{2+} activado por voltaje. El valor de la conductancia es:

$$g_{Ca} = \bar{g}_{Ca} m^3 h$$

Los valores m y h representan la activación e inactivación del canal y se calculan de la siguiente manera:

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(1 - m) - \beta_m m$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(1 - h) - \beta_h h$$

La corriente de Ca^{2+} está dada por:

$$I_{Ca} = (g_{Ca})(V - V_{Ca})$$

Los diversos valores de α y β para calcular n, m y h se obtienen de la siguiente manera:

$$\alpha_m = 0.1 \frac{25 - V - V'}{\exp\left(\frac{25 - V - V'}{10}\right) - 1}$$

$$\beta_m = 4 \exp\left(\frac{-V - V'}{18}\right)$$

$$\alpha_h = 0.07 \exp\left(\frac{-V - V'}{20}\right)$$

$$\beta_h = \frac{1}{\exp\left(\frac{30 - V - V'}{10}\right) + 1}$$

$$\alpha_n = 0.01 \frac{10 - V - V^*}{\exp\left(\frac{10 - V - V^*}{10}\right) - 1}$$

$$\beta_n = 0.125 \exp\left(\frac{-V - V^*}{80}\right)$$

Una última corriente es considerada en el modelo para no despreciar las fugas que pueda haber de otros iones y se expresa como:

$$I_L = (g_L)(V - V_L)$$

Combinando todas las corrientes se plantea la ecuación que determina el cambio en el potencial de membrana.

$$C_m \frac{dV}{dt} = -I_K - 2I_{Ca} - I_L$$

Las ecuaciones para modelar el comportamiento eléctrico de los canales iónicos y la célula fueron tomadas de los estudios realizados por Hodgkin y Huxley [1952], quienes reportaron una serie de artículos para explicar la excitabilidad de células nerviosas (Hodgkin & Huxley, 1952). En dicho trabajo se puede ver a detalle las consideraciones hechas para modelar la actividad eléctrica de las células.

- 4) Pérdida de Ca^{2+} citosólico activado por glucosa. Esta última ecuación del modelo describe el comportamiento del Ca^{2+} en el interior de la célula:

$$\frac{dc}{dt} = f(-k_1 I_{Ca} - k_c c)$$

En la Tabla 2 se muestran los parámetros utilizados para resolver las ecuaciones del modelo. Para esta solución se utilizó un programa ya reportado para el software Mathematica que emplea diferencias finitas para sistemas rígidos.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
C_m	1 ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)	V_L	-40 (mV)
\bar{g}_{KCa}	0.09 (mS/cm^2)	V^*	30 (mV)
\bar{g}_K	12 (mS/cm^2)	V'	50 (mV)
\bar{g}_{Ca}	6.5 (mS/cm^2)	K_d	1 (μM)
\bar{g}_L	0.004 (mS/cm^2)	F	0.007
V_K	-75 (mV)	K_1	0.0275 ($\frac{\mu\text{Mcm}^2}{\text{nC}}$)
V_{Ca}	100 (mV)	K_c	0.02 (1/ ms)

Tabla 2.- Parametros utilizados para el modelo de Chay-Keizer

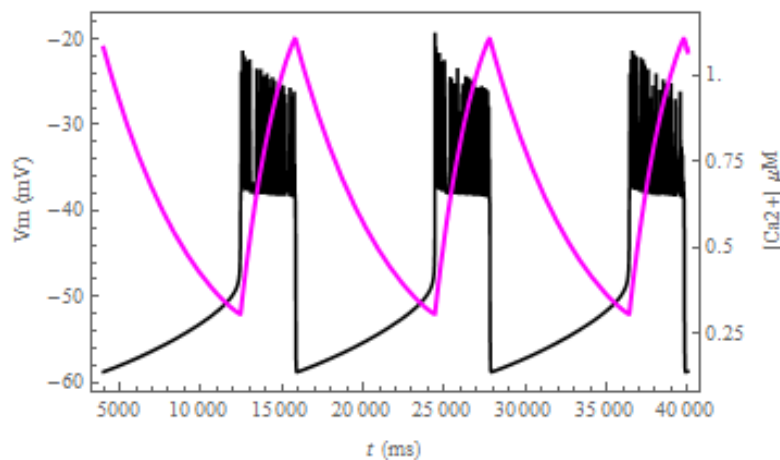


Ilustración 13.- Comportamiento de la actividad eléctrica y oscilaciones de calcio con los parametros de la Tabla 2.

En este modelo el parámetro que ocupa la posición de control principal es el calcio. En la ilustración 13 se observa que la ráfaga de actividad eléctrica se genera cuando el valor de Ca^{2+} es mínimo y se apaga en el punto máximo del Ca^{2+} . Por otra parte se observó que las oscilaciones cesaron cuando se disminuyó el valor de la conductancia de calcio g_{Ca} (Ilustración 14).

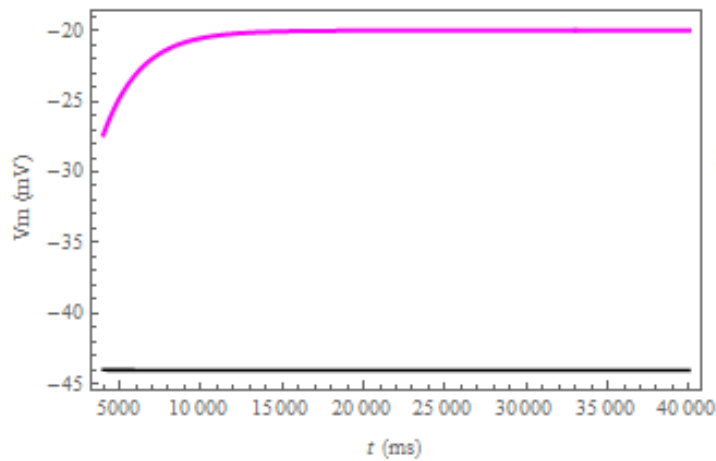


Ilustración 14.- Estado estable del sistema cuando se disminuye el valor de g_{KATP} ; Parametros de la Tabla 2, excepto $g_{KATP}=2$.

2.3.2 Modelo de Diderichsen.

El último modelo de esta revisión simula ciertos comportamientos de la actividad eléctrica observada experimentalmente en células alfa (Diderichsen & Göpel, 2006).

De la misma manera que con el modelo de Chay-Keizer se consideran canales iónicos que son modelados de acuerdo a las cinéticas de Hodgkin-Huxley, pero en este modelo son siete los canales tomados en cuenta para describir la actividad eléctrica de la célula alfa: dos canales de Ca^{2+} (Tipo T y L), una corriente de Na^{+} activada por voltaje, tres corrientes de K^{+} (Tipo A, rectificador retardado o DR por sus siglas en inglés y ATP) y una corriente de fuga.

La corriente eléctrica generada por estos canales se modela con la siguiente ecuación:

$$I_i = g_i(V - V_i)$$

$$g_i = g_i^* m_i^l h_i$$

Para modelar la activación e inactivación del canal (m y h) se toman en cuenta las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dm_i}{dt} = \frac{m_i^\infty(V) - m_i}{\tau_i^m(V)}$$

$$\frac{dh_i}{dt} = \frac{h_i^\infty(V) - h_i}{\tau_i^h(V)}$$

En este punto del modelo, a diferencia del enfoque de Hodgkin-Huxley, se introducen un par de funciones para describir la activación e inactivación en el estado estacionario (m_i^∞ y h_i^∞) y las constantes de tiempo (τ_i^h y τ_i^m)

Una función sigmoïdal para m_i^∞ y h_i^∞ que se define de la siguiente manera:

$$\text{sig}(V, V^*, S^*) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{-(V - V^*)}{S^*}\right)}$$

Y una función de tipo campana para τ_i^h y τ_i^m

$$\text{bell}(V, V^*, S^*, \tau^*, \tau_0) = \frac{\tau^*}{\exp\left(\frac{-(V - V^*)}{S^*}\right) + \exp\left(\frac{(V - V^*)}{S^*}\right)} + \tau_0$$

La última ecuación considerada es formulada a partir de la Ley de conservación de cargas o Ley de corrientes de Kirchoff y queda expresada de la siguiente forma:

$$0 = C_m \frac{dV}{dt} + \sum_i I_i$$

Todos los parámetros utilizados se encuentran en el artículo principal (Diderichsen & Göpel, 2006). El artículo analiza las distintas características de cada uno de los canales considerados para el modelo. Para el propósito de este trabajo solo se analizó el comportamiento de la actividad eléctrica cuando se varía la conductancia g_{KATP} que es, desde nuestro enfoque, el parámetro de bifurcación. Ya que nos permite entrar y salir del periodo de ráfagas en el voltaje cuando se disminuye lentamente desde un valor de 0.5 nS hasta 0 nS y del mismo modo cuando se eleva nuevamente a 0.5 nS. (Ilustración 15).

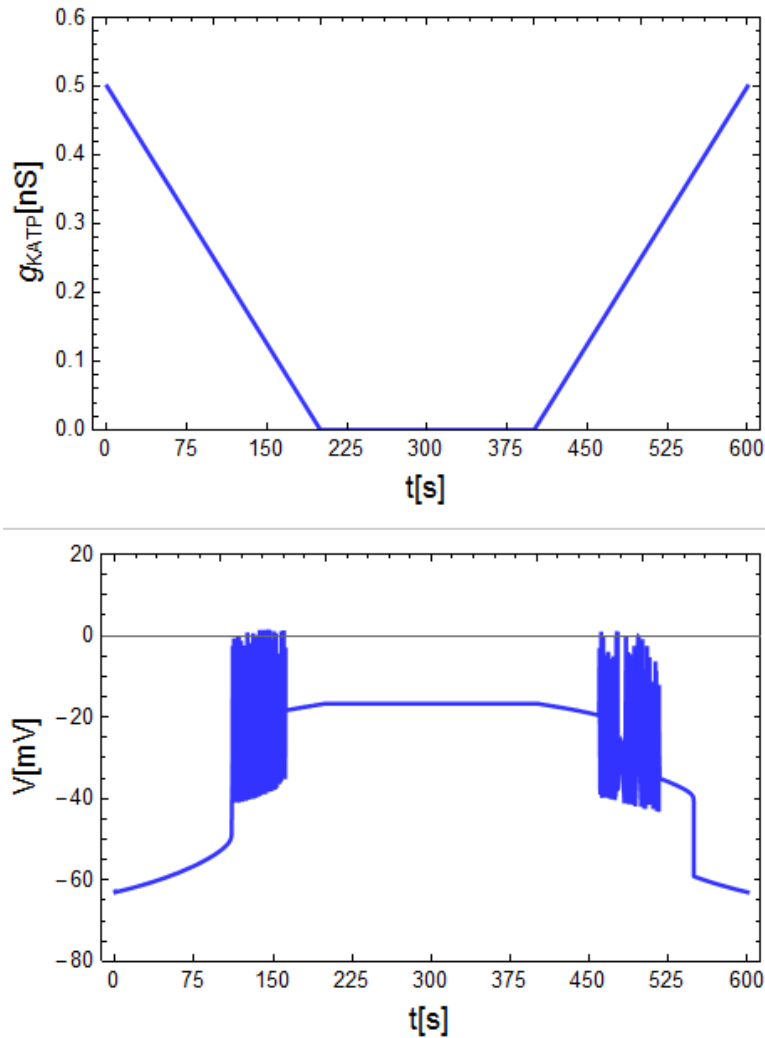


Ilustración 15.- Comportamiento del voltaje (abajo) en función del valor de g_{KATP} (arriba)(Wolfram Mathematica).

La simulación de este modelo coincide con los datos experimentales en los que se disminuye la conductancia K_{ATP} bloqueando los canales, lo que provoca la despolarización de la membrana y la subsecuente ráfaga de actividad eléctrica. Para reproducir este resultado nuevamente se utilizó el software Mathematica que resuelve las ecuaciones con un método de diferencias finitas llamado BDF (Backward Differentiation Formula). Por último se realizó un diagrama de bifurcación que muestra las dinámicas del potencial de membrana en función del g_{KATP} (Ilustración 16).

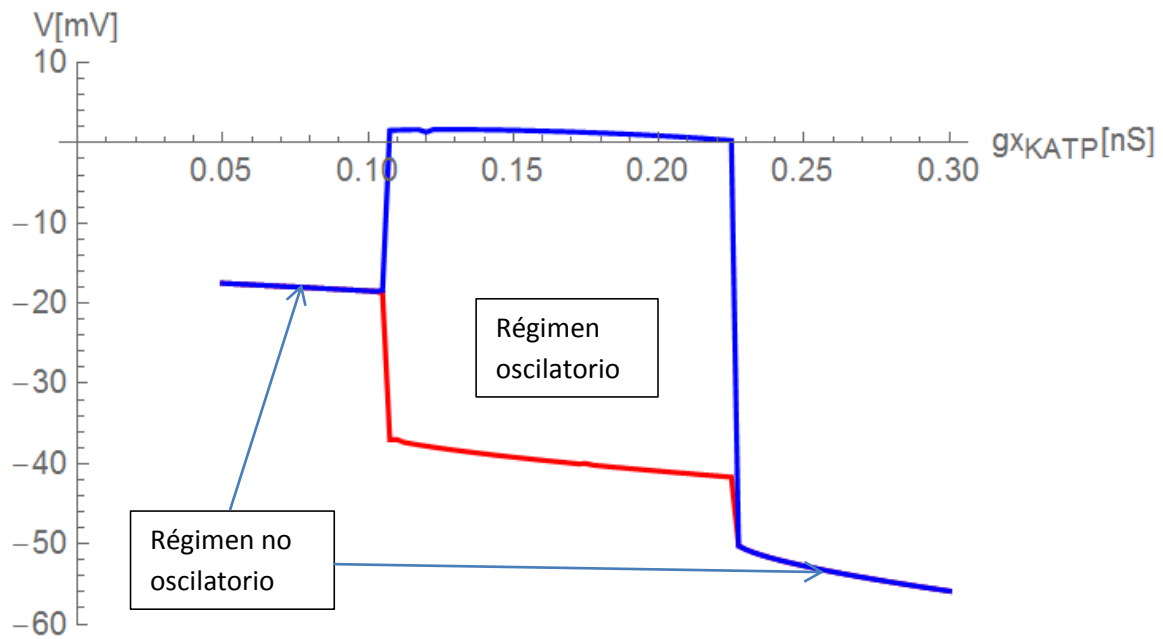


Ilustración 16.- Diagrama de bifurcación del modelo de Diderichsen que representa la dinámica del Voltaje en función del parámetro de bifurcación g_{KATP} (Wolfram Mathematica).

3. Resultados

3.1 Construcción del modelo

El diagrama mostrado en la figura 17 define las etapas realizadas para la realización de este proyecto de tesis. Tal como se muestra, partiendo del modelo de (Diderichsen, 2006) presentado en la sección anterior, se hicieron varias modificaciones con el propósito de simular oscilaciones de Ca^{2+} para luego analizar su comportamiento en relación con la actividad eléctrica y las dinámicas de ATP.

En primer lugar, adicionalmente a las corrientes consideradas en el modelo original de Diderichsen, se ha añadido una corriente de Ca^{2+} (Tipo N) que se ha reportado es de suma importancia para la secreción de glucagón (Gromada, et al., 1997; Watts & Sherman, 2014). Por lo tanto fue considerada en el modelo con parámetros proveídos por González-Vélez para célula alfa (González-Vélez, 2010).

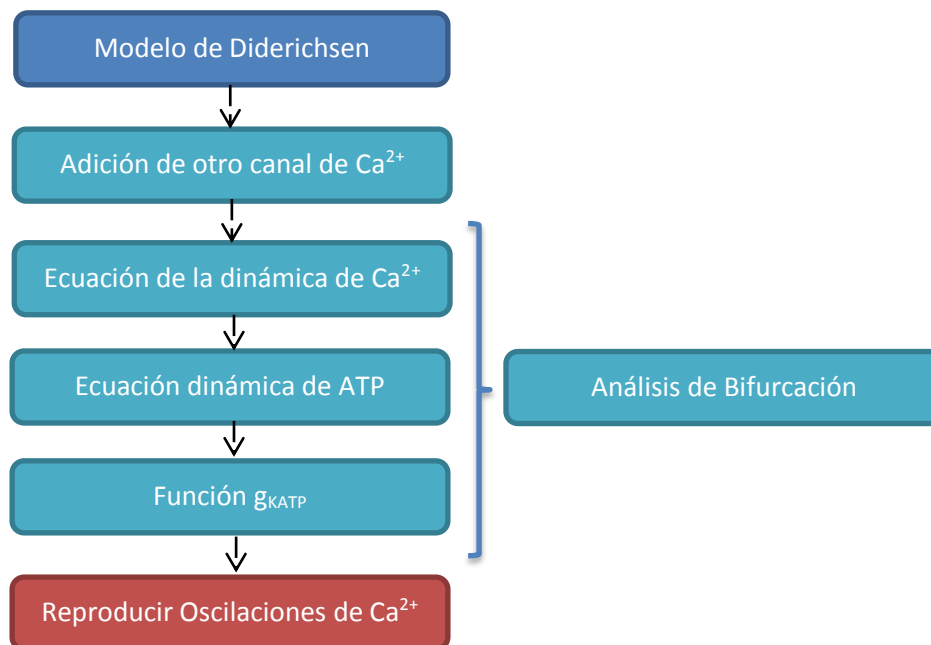


Ilustración 17.- Esquema por etapas para el desarrollo del proyecto.

Posteriormente se añadió una ecuación que modela la dinámica de Ca^{2+} intracelular:

$$\frac{dC}{dt} = v_b + f \left[-\frac{I_{\text{Ca},T} + I_{\text{Ca},L} + I_{\text{Ca},N}}{2FV} - \beta C \right] \dots \text{(Ec.1)}$$

Donde v_b es una constante referente a las concentraciones basales de Ca^{2+} , f es la fracción de Ca^{2+} libre en el citosol, F la constante de Faraday, V el volumen de la célula y β una constante de velocidad de remoción de Ca^{2+} . Esta es una ecuación similar a la utilizada por Chay-Keizer [1983] y es la forma más común de modelar la dinámica de Ca^{2+} cuando se consideran canales que son dependientes del voltaje ($I_{\text{Ca},T}$, $I_{\text{Ca},L}$, $I_{\text{Ca},N}$) (Fridlyand & Philipson, 2012). Los valores utilizados para las simulaciones se muestran en la Tabla 3. Nótese que en particular el análisis de bifurcación, que se discute más adelante, se realizó sobre el parámetro beta por lo que no se marca un valor específico de inicio.

Parametro	Value
f	0.01 ^a
F	96,487 C/mol ^a
V	623.61 μm^3 ^b
β	*

Tabla 3.- Parámetros utilizados para la ecuación de Ca^{2+} incluida en el modelo propuesto. El asterisco del parámetro beta indica que se probaron varios valores con base en el análisis de bifurcación que se discute más adelante. Los otros valores son de ^a (Fridlyand & Philipson, 2012) y ^b (González-Velez, et al., 2012)

Una vez agregada la ecuación de Ca^{2+} al modelo, el objetivo es simular el comportamiento de las oscilaciones de Ca^{2+} observadas experimentalmente. Esto requiere encontrar los valores adecuados del parámetro β .

Como primer paso se consideró al parámetro g_{KATP} (conductancia del canal de K^+ sensible a ATP) como una función decreciente y creciente como se describió en el apartado del Modelo de Diderichsen (Figura 15, capítulo anterior) y se resolvió el sistema de ecuaciones en el software Mathematica con el método de diferencias finitas BDF ya mencionado, obteniendo las dinámicas de Ca^{2+} a diferentes valores del parámetro β (Figuras 18 y 19).

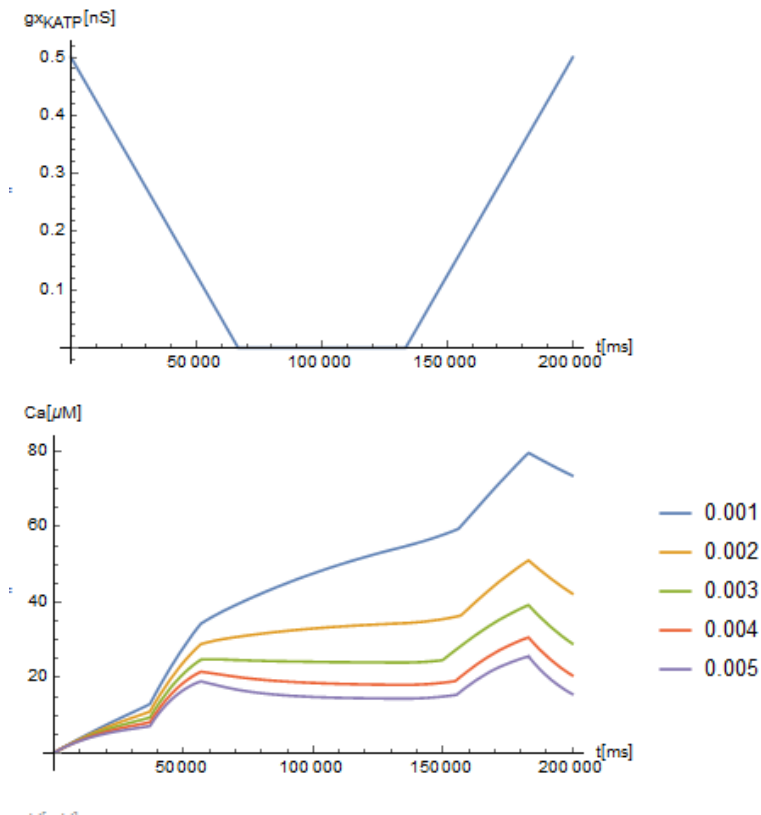


Ilustración 18.- Dinámicas de Ca^{2+} con valores de β desde 0.001 hasta 0.005 (Wolfram Mathematica).

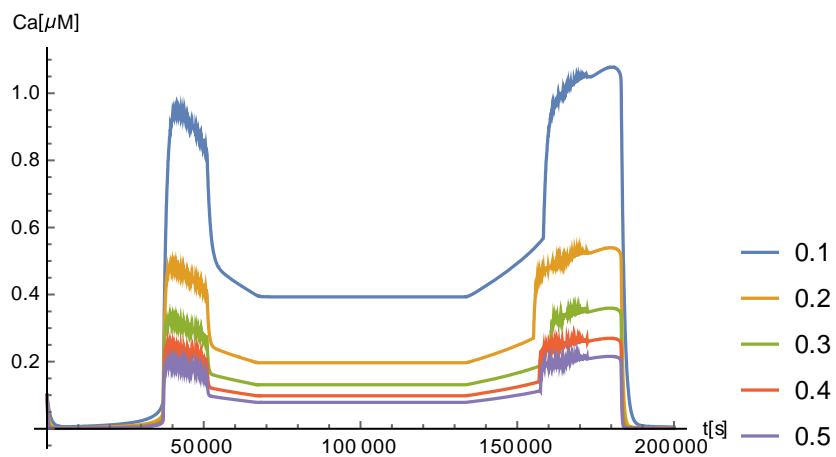


Ilustración 19.- Dinámicas de Ca^{2+} con valores de β desde 0.1 hasta 0.5 (Wolfram Mathematica).

En las ilustraciones 18 y 19 se observan los distintos comportamientos de las dinámicas de calcio a diferentes valores de β y con variación decreciente y creciente del g_{KATP} . Se observa que cuando el valor de β se encuentra entre 0.2 y 0.4, el rango de valores de Ca^{2+} es similar al de las oscilaciones observadas experimentalmente (entre 0.1 y 0.5 μM), tal como los mostrados en la figura 4.

Como siguiente paso se analiza cómo cambia la dinámica de Ca^{2+} y el potencial de membrana (actividad eléctrica) conforme varía la conductancia g_{KATP} . Esto se hace mediante un análisis de bifurcación, graficando los valores en el estado estacionario para diferentes valores de g_{KATP} , utilizando la herramienta XPPAUT (Figura 20).

Como se observa en este diagrama de bifurcación, existen al menos tres regímenes dinámicos distintos para el calcio (Ca) y para el potencial de membrana (V) dependiendo de los valores de la conductancia g_{KATP} . El primero es cuando g_{KATP} tiene valores menores a 0.1 aproximadamente (línea en rojo), ya que el Ca y el V en el estado estacionario son estables y cercanos a $0.2 \mu\text{M}$ y a -20 mV , respectivamente. El segundo régimen es oscilatorio y aparece cuando g_{KATP} toma valores entre 0.1 y 0.25, aproximadamente; aquí tanto el Ca como el V oscilan, apareciendo ráfagas con valores alrededor de $0.35 \mu\text{M}$ para Ca y entre 0 y -40 mV para V (líneas verdes). Finalmente si se eleva la conductancia por arriba de 0.25, aparece el tercer régimen dinámico donde los valores de Ca y V tienden a $0.1 \mu\text{M}$ y -65 mV , respectivamente.

En la figura 21 se observa la concentración del Ca^{2+} de estado estacionario para diversos valores del g_{KATP} . Esto corresponde con lo descrito previamente en el diagrama de bifurcación.

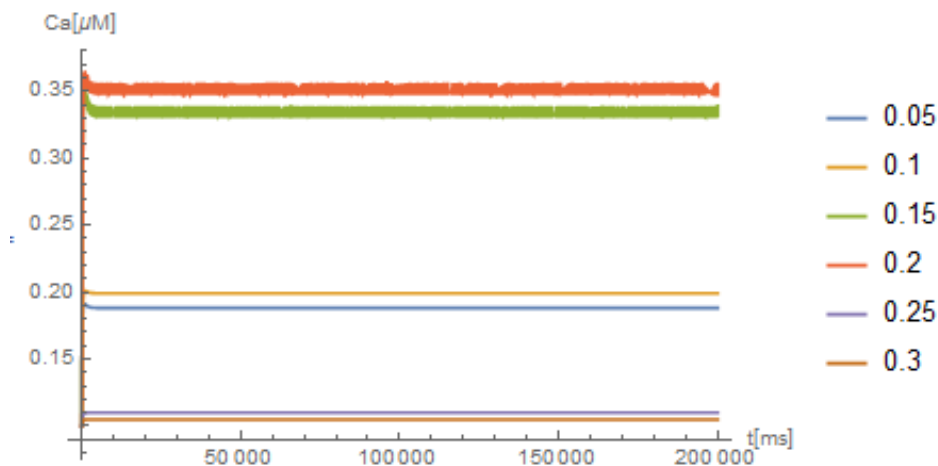


Ilustración 20.- Concentración de Ca^{2+} con valores de g_{KATP} desde 0.05 hasta 0.3 (Wolfram Mathematica).

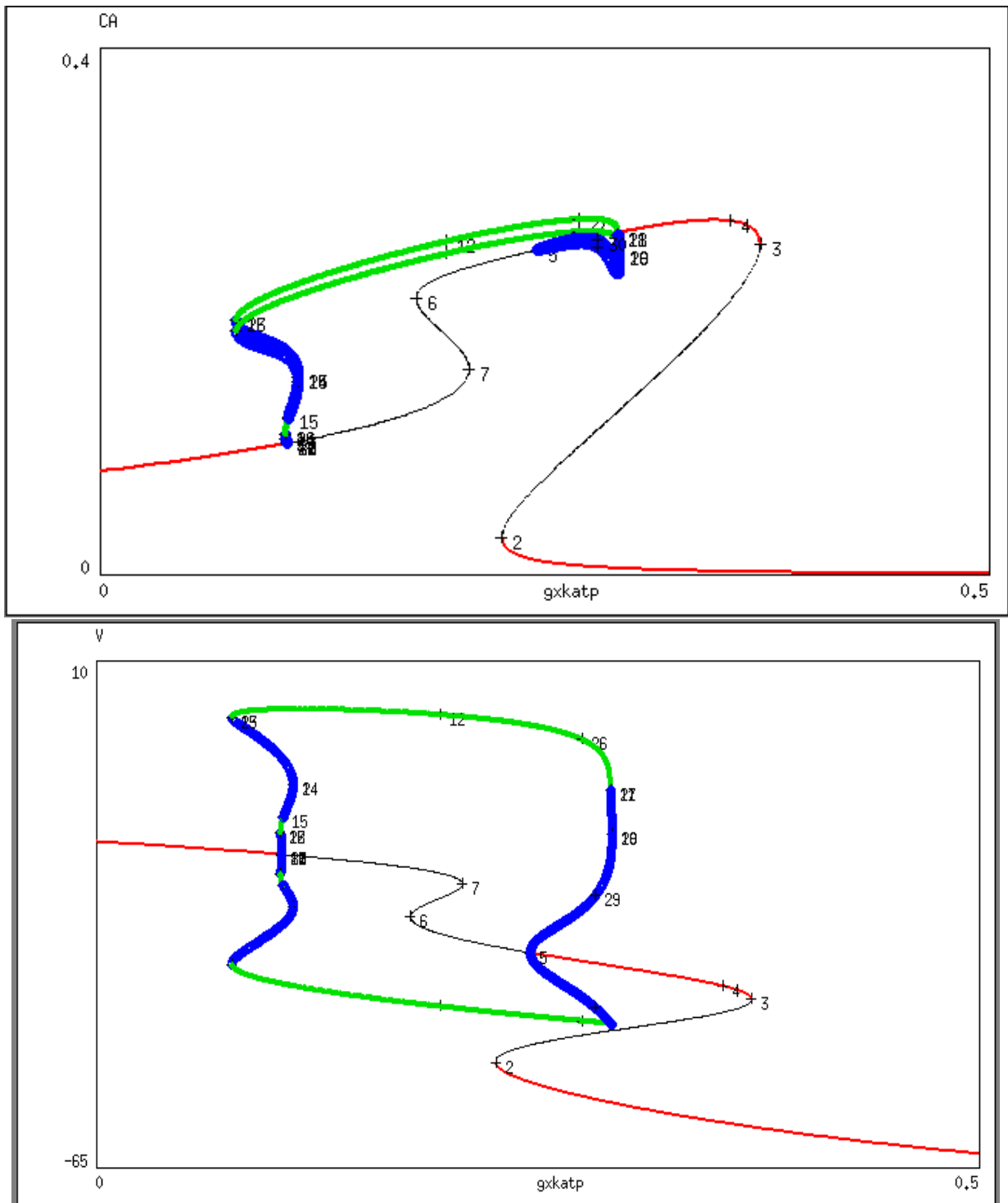


Ilustración 21.- Diagrama de bifurcación de Ca^{2+} (arriba) y de potencial de membrana (abajo) en función de la variable g_{KATP} (XPPAUT).

Para continuar con el estudio de las dinámicas de Ca^{2+} se analizaron las diferencias en el comportamiento del Ca^{2+} cuando la conductancia g_{KATP} crece y decrece a diferentes velocidades, ya que el diagrama de bifurcación de la figura 20 sugiere que el comportamiento del Ca^{2+} no será el mismo si la conductancia va disminuyendo o aumentando a partir de un valor inicial. El objetivo nuevamente es simular oscilaciones de calcio cuyas amplitud, duración y frecuencia sean similares a las oscilaciones observadas experimentalmente (Quoix, et al., 2009; Quesada, et al., 2008).

La variación en la conductancia de los canales K_{ATP} se modeló proponiendo una ecuación para la dinámica de ATP la cual depende de las concentraciones de Ca^{2+} . Esto es razonable dado que la mitocondria, que es la principal responsable de la producción de ATP intracelular, es modulada por la concentración de calcio intracelular. Este es un proceso altamente no lineal y complejo, lo cual ha llevado a proponer modelos sofisticados para simular su comportamiento en diferentes tipos celulares (ver por ejemplo, Wacquier, 2016). Este tipo de modelos escapa a los alcances de esta tesis por lo cual se propuso una primera aproximación que modela las variaciones de ATP debidas solamente a la producción de ATP promovida por el calcio intracelular (C) en balance con la pérdida de ATP debida al consumo por los mecanismos de transporte activo. Esto redunda en la ecuación siguiente:

$$\frac{d[\text{ATP}]}{dt} = v_1 \pm k_2 \frac{C^n}{K^n + C^n} - k_1[\text{ATP}] \dots (\text{Ec.2})$$

donde C es la concentración de calcio intracelular, K es la afinidad por ese calcio considerando un proceso enzimático de orden n , v_1 es la concentración basal de ATP, k_1 es la constante de velocidad asociada al proceso de consumo de ATP por bombas de Ca^{2+} , y k_2 es la velocidad asociada al proceso controlado por Ca^{2+} que puede incrementar o disminuir la cantidad de ATP intracelular (según el signo en la ecuación). Es importante remarcar que es intención de este trabajo estudiar cómo afectan estos dos procesos metabólicos a la actividad eléctrica y finalmente, a las oscilaciones de Ca^{2+} . Cabe señalar que estas velocidades deben ser pequeñas comparados con los otros parámetros cinéticos debido a que la síntesis y el consumo de ATP (metabolismo mitocondrial) son mucho más lentos que la cinética de los canales dependientes de voltaje. Para el modelo propuesto, el valor adecuado de estos parámetros se estimó utilizando análisis teórico.

Con base en las variaciones de ATP, se estima que la conductancia g_{KATP} decrecerá de forma inversamente proporcional a la concentración de ATP en cada tiempo, lo cual nos permite reemplazar la conductancia artificialmente variable utilizada en (Diderichsen, 2006) por una función como la siguiente:

$$g_{K,ATP} = \bar{g}_{K,ATP}/[ATP] \dots (\text{Ec.3})$$

donde $\bar{g}_{K,ATP}$ es la conductancia máxima de canales K_{ATP} .

El modelo propuesto es entonces un modelo eléctrico-metabólico simple que permite simular la actividad eléctrica intermitente, regulada por variaciones en el ATP y en la conductancia de los canales K_{ATP} , y que finalmente da origen a oscilaciones de Ca^{2+} intracelular. Más aún, este modelo se propone para poder analizar el efecto del Ca^{2+} en la producción y consumo de ATP vía la mitocondria. Los valores de los parámetros utilizados en este trabajo fueron propuestos analizando principalmente las oscilaciones de Ca^{2+} simuladas, como se describe en la siguiente sección.

3.2 Simulaciones

El modelo completo propuesto con el que se obtuvieron las simulaciones que se muestran en esta sección consta de las ecuaciones de (Diderichsen & Göpel, 2006), y mencionadas en la sección 2.3, más las ecuaciones (Ec.1), (Ec.2) y (Ec.3). Los valores de los parámetros para las nuevas ecuaciones se dan en las Tablas 4 y 5. Nótese que k_2 cambia de signo de acuerdo a si representa el proceso de producción o consumo de ATP debido al incremento de Ca^{2+} intracelular.

Lo primero que se estudió fue el efecto del Ca^{2+} intracelular en la síntesis de ATP mitocondrial. Esto se llevó a cabo estimando un valor positivo de k_2 , como se indica en la Tabla 4. Las simulaciones obtenidas están en las figuras 22 y 23.

Parámetro	Valor
v_1	0.18 $\mu\text{M/s}$
k_1	0.00006 s^{-1}
k_2	+0.435 $\mu\text{M/s}$
n	4
K	0.35 μM

Tabla 4. Valores de los parámetros utilizados para las figuras 22 y 23.

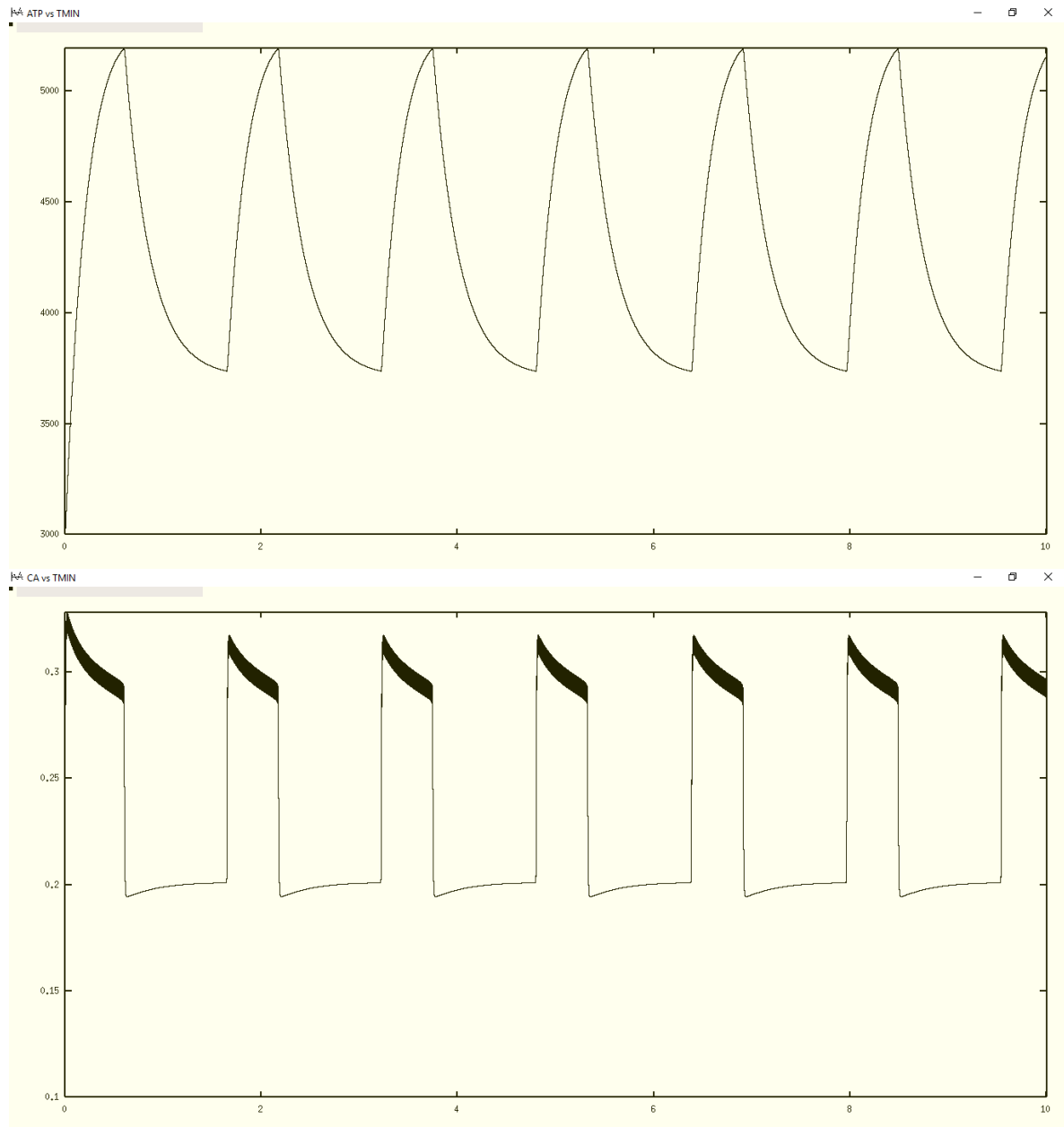


Ilustración 22. Simulación de la concentración de ATP (arriba) y Ca^{2+} intracelular (abajo) cuando el Ca^{2+} promueve la síntesis de ATP. Tiempo de simulación: 10 minutos. [ATP] y [Ca] en microMolar.

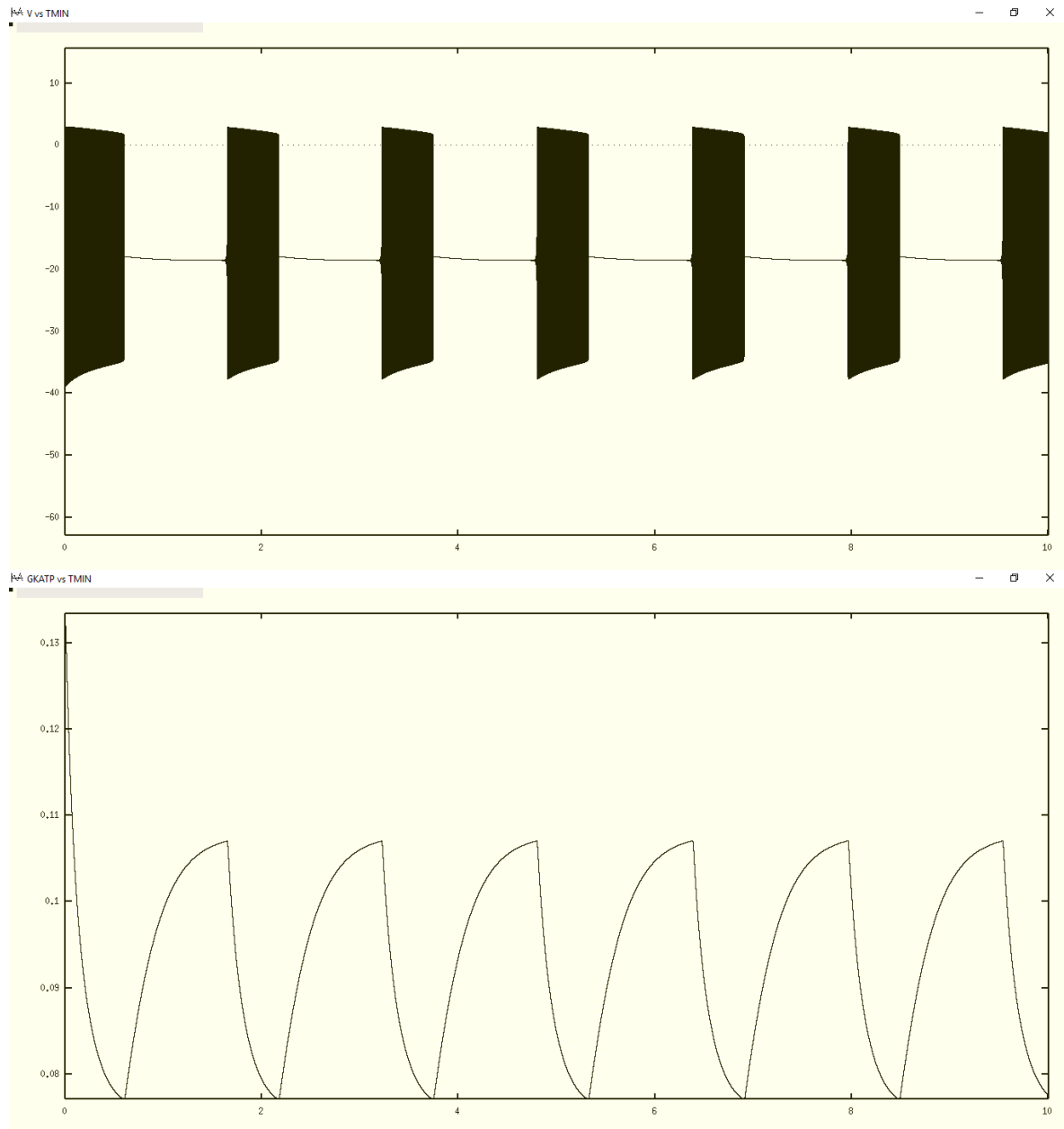


Ilustración 23. Simulación del potencial de membrana, V, (arriba) y la conductancia de canales K_{ATP} (abajo) cuando el Ca^{2+} promueve la síntesis de ATP. Tiempo de simulación: 10 minutos. V en miliVolts y GKATP en nanoSiemens.

Con estas simulaciones se observa que el modelo reproduce la aparición de ráfagas de potenciales de acción controladas por la disminución de la conductancia g_{KATP} (Ilustración 23), tal como se discute en (Diderichsen, 2006). Nuestro modelo añade a estas observaciones que la conductancia es a su vez controlada por cambios en la concentración de ATP (Ilustración 22), lo que complementa el modelo eléctrico inicial y enlaza la parte metabólica de la célula alfa de una manera directa.

También se muestran las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular (Ilustración 22) debidas a la actividad eléctrica y al consumo metabólico. Estas variaciones de calcio están en un rango fisiológico (entre 0.19 y 0.35 μM). Observamos que en el estado estacionario el potencial de membrana permanece alrededor de -20 mV y que cuando la conductancia va creciendo se entra en la zona de régimen oscilatorio, como sucedía con el modelo eléctrico inicial (Ilustración 20).

Estos resultados indican que las oscilaciones de Ca^{2+} son al menos en parte debidas al proceso de síntesis de ATP regulado por calcio, tal como ha sido reportado para células beta de páncreas (McKenna, et al., 2016), y que como se ha reportado en (Li, et al., 2015) para células alfa, el nivel de ATP también es oscilatorio.

El segundo análisis que se hizo con el nuevo modelo se enfocó a estudiar el efecto del Ca^{2+} intracelular en el consumo de ATP. Para ello se estimó un valor negativo de k_2 , como se indica en la Tabla 4, en el cual se considera que el consumo de ATP es proporcional a la cantidad de ATP presente en cada tiempo. Nótese que los demás parámetros son los mismos que para las simulaciones anteriores, a fin de hacerlas comparables. Los resultados obtenidos bajo este supuesto se muestran en las ilustraciones 24 y 25.

Parámetro	Valor
v_1	0.3 $\mu\text{M/s}$
k_1	0.0001 s^{-1}
k_2	-0.0002 $s^{-1} * [\text{ATP}]$
n	4
K	0.35 μM

Tabla 5. Valores de los parámetros utilizados para las ilustraciones 24 y 25.

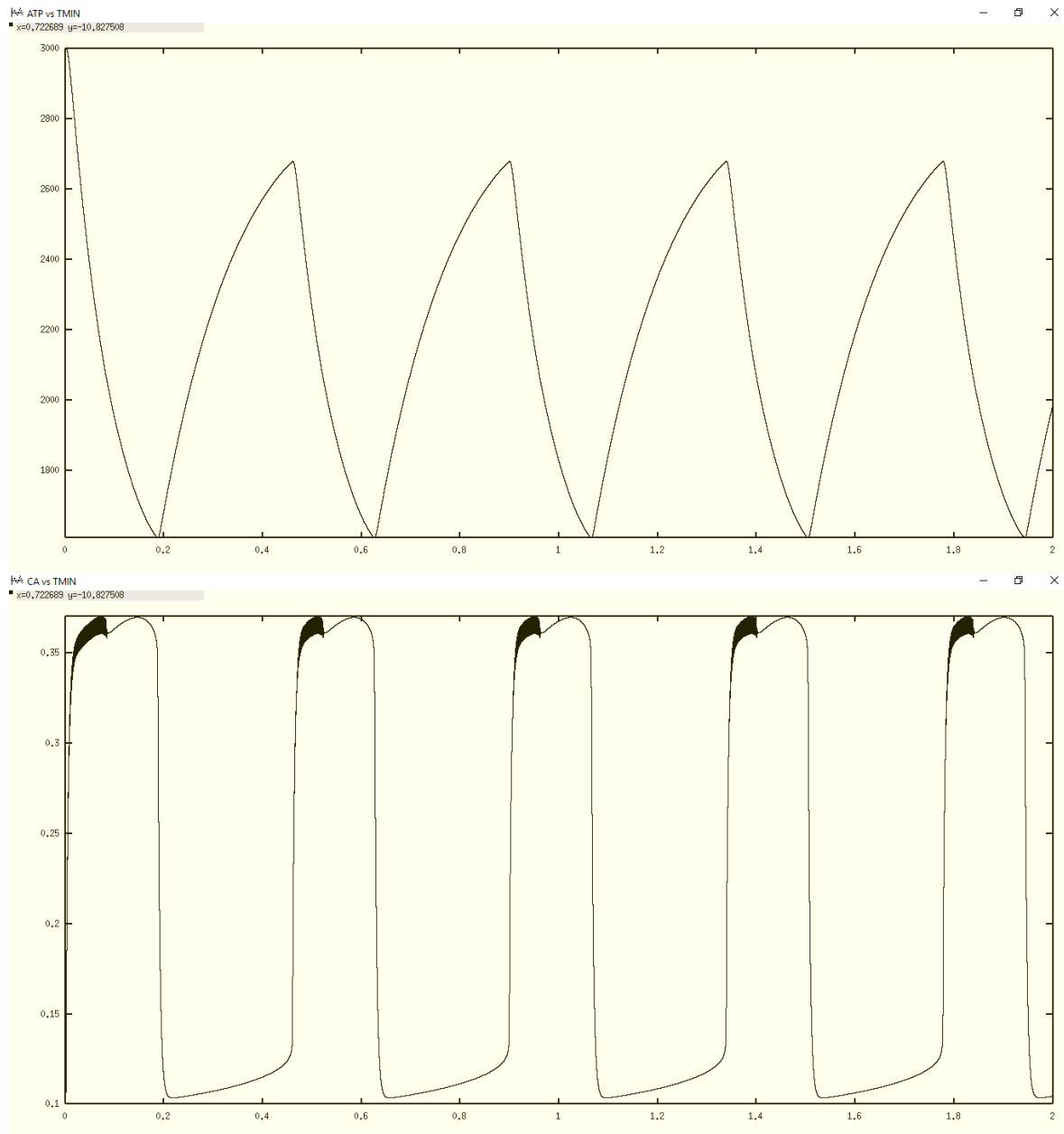


Ilustración 24. Simulación de la concentración de ATP (arriba) y Ca^{2+} intracelular (abajo) cuando el Ca^{2+} promueve el consumo de ATP. Tiempo de simulación: 2 minutos. [ATP] y [Ca] en microMolar.

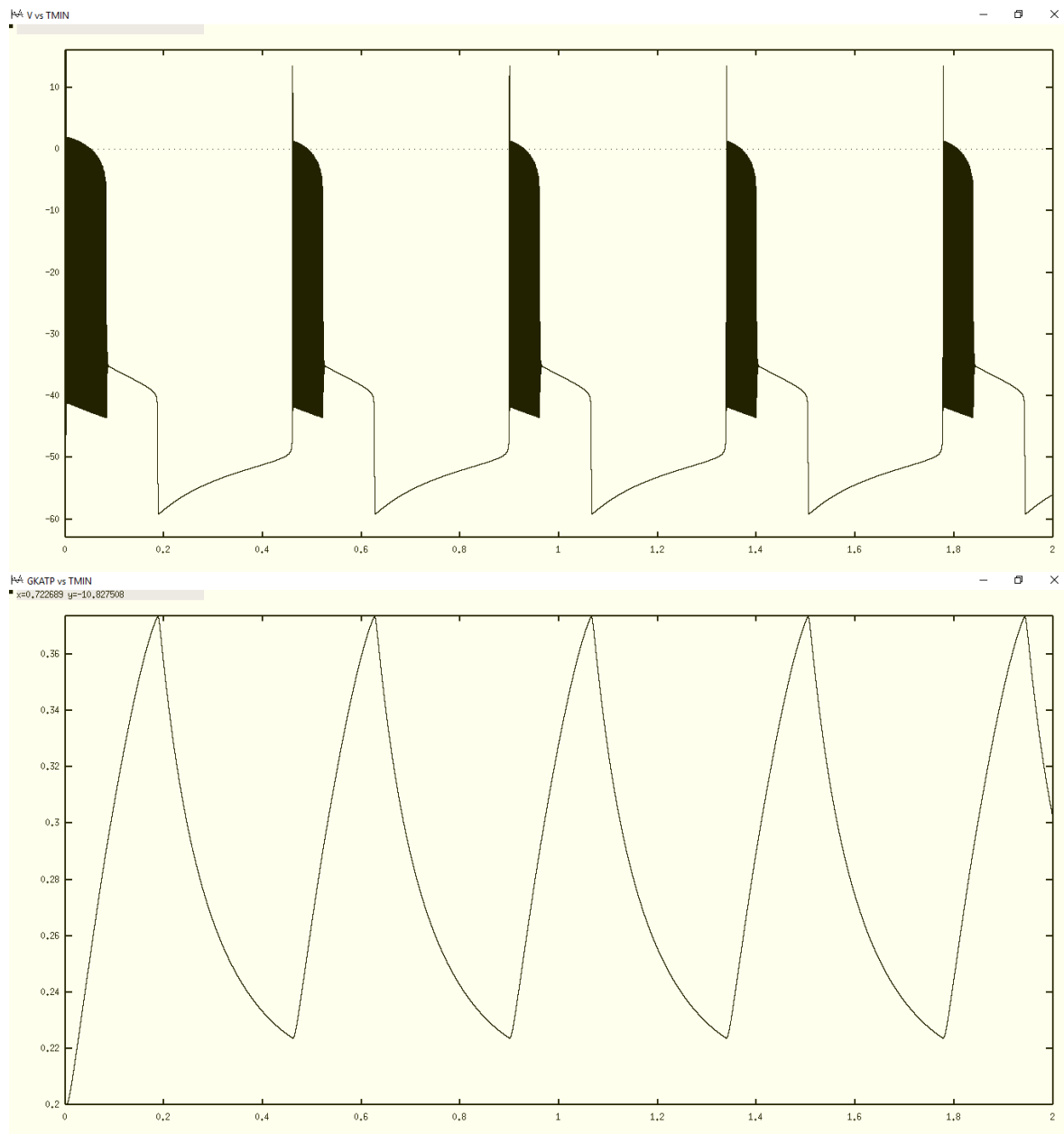


Ilustración 25. Simulación del potencial de membrana, V , (arriba) y la conductancia de canales K_{ATP} (abajo) cuando el Ca^{2+} promueve el consumo de ATP. Tiempo de simulación: 2 minutos. V en miliVolts y GK_{ATP} en nanoSiemens.

En la ilustración 25 nuevamente se observa el control de las ráfagas de potenciales de acción por variaciones en la conductancia de canales K_{ATP} . Estos potenciales de acción, igual que antes, comienzan cerca de -40mV y alcanzan 0 mV, sólo que ahora el potencial de membrana vuelve al potencial de reposo cuando la conductancia va decreciendo, lo cual se aproxima más a las observaciones experimentales de (Quoix, et al., 2009). Las oscilaciones de Ca^{2+} (ilustración 24) por su lado, están en un rango de amplitud adecuado pero no en la escala temporal esperada (aproximadamente 1 oscilación por segundo, misma referencia). Sin embargo, es interesante notar que el ATP también oscila y que ahora está completamente fuera de fase respecto del Ca^{2+} , como se ha reportado en células alfa (Li, et al., 2015).

Con fines comparativos, se muestra una simulación de la dinámica de Ca^{2+} en la misma escala temporal para ambos procesos (Ilustración 26). Se observa que en ambos casos las oscilaciones alcanzan valores pico similares pero que la frecuencia de oscilación es distinta, lo cual podría ser indicativo de que el proceso metabólico de consumo de ATP es más rápido y requiere más Ca^{2+} que el proceso de síntesis. Esto es algo que pretende estudiarse con más detalle en un trabajo futuro. Por el momento, nuestro modelo nos permite corroborar las observaciones experimentales de (Li, et al., 2014): 1) Las oscilaciones de ATP ocurren fuera de fase respecto a las de Ca^{2+} , y 2) En condiciones de estimulación (gran incremento de Ca^{2+} intracelular), el Ca^{2+} ejerce dos efectos opuestos, incrementa el transporte activo de Ca^{2+} que consume gran cantidad de ATP, y decrementa la producción de ATP. Sólo por tener una idea del efecto de ambos procesos, se incluye una gráfica que adiciona las oscilaciones de Ca^{2+} mostradas en la Ilustración 26 (Ilustración 27).

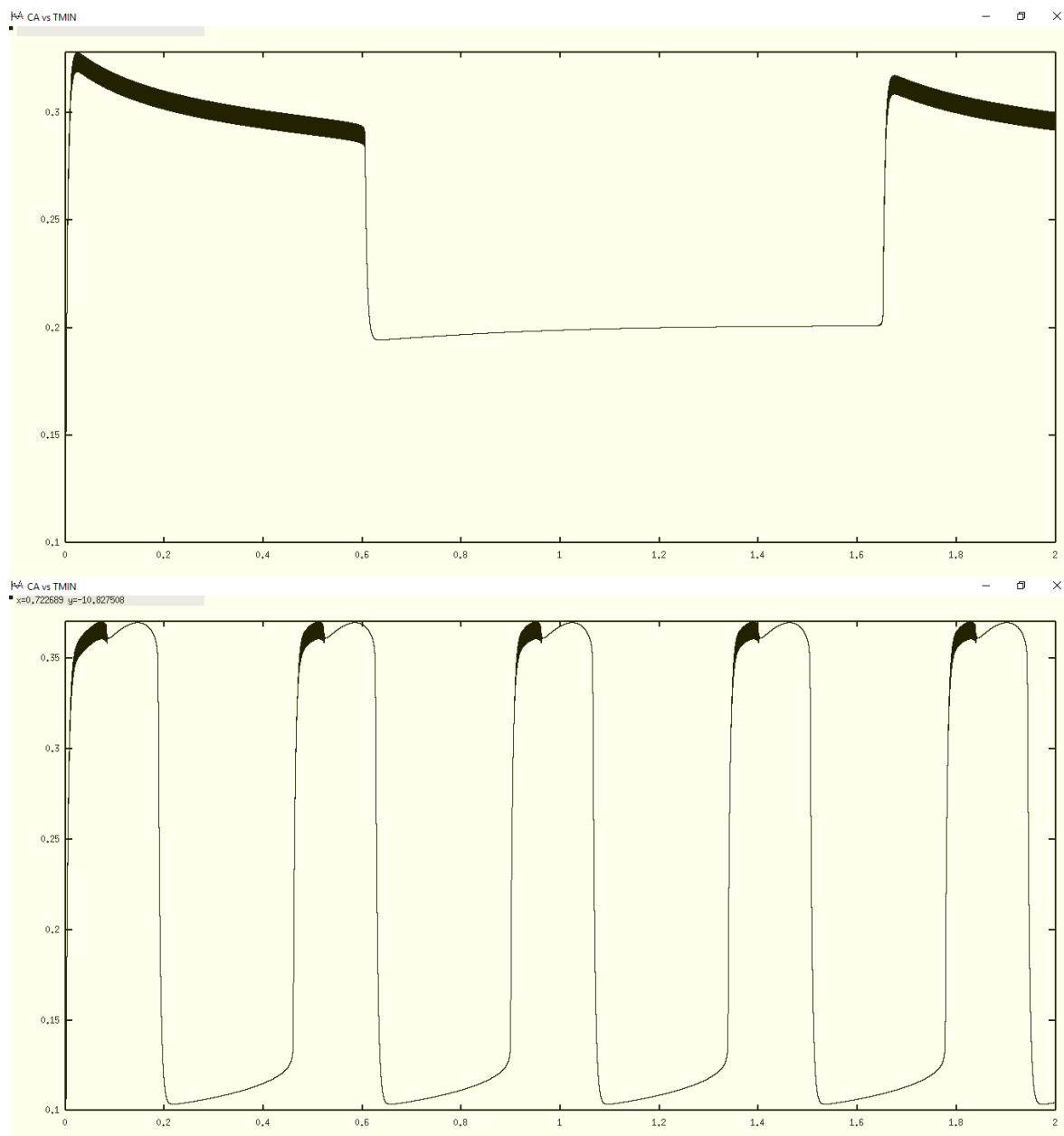


Ilustración 26. Oscilaciones de Ca^{2+} obtenidas cuando el calcio promueve la síntesis (arriba) y el consumo (abajo) de ATP en la célula. Tiempo de simulación: 2 minutos. Ca^{2+} en microMolar.

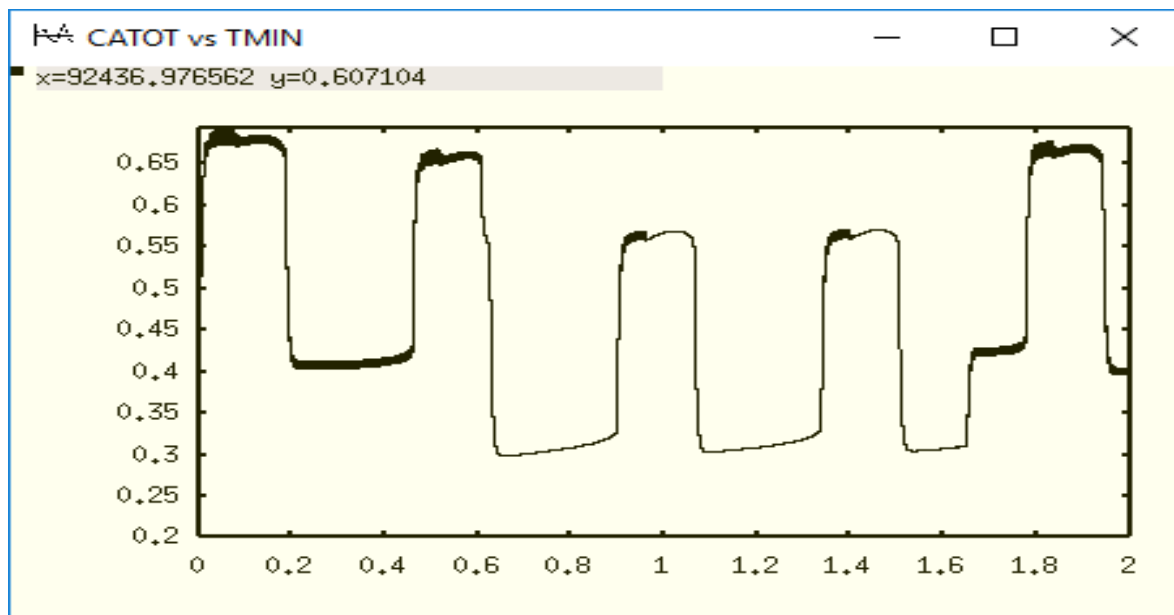


Ilustración 27. Oscilaciones de Ca^{2+} obtenidas cuando el calcio promueve tanto la producción como el consumo de ATP en la célula. Tiempo de simulación: 2 minutos. CaTOT en microMolar.

Otra posibilidad que puede explicar la relación entre los cambios en la conductancia de canales K_{ATP} que llevan a la actividad eléctrica y a las oscilaciones de Ca^{2+} en células alfa es la presencia de oscilaciones glicolíticas. Esto ha sido bien estudiado y verificado para células beta, las cuales también responden a cambios metabólicos (Bertram, et al., 2004). Esta posibilidad se exploró mediante la simulación del modelo propuesto por Bertram para célula beta (Bertram, et al., 2004), haciendo las adecuaciones necesarias para representar una célula alfa (diferente velocidad de la glucokinasa, baja densidad de canales K_{ATP} y baja capacitancia celular, ver pie de la Ilustración 28).

Los resultados de este análisis indicaron que la célula alfa puede estar eléctricamente activa a baja glucosa sin depender de las oscilaciones glicolíticas (FBP). Esto es, que a diferencia de lo que se reporta en (Bertram, 2004) para células beta, en el caso de célula alfa los silencios de la FBP no detienen las oscilaciones del potencial de membrana, pues como se muestra en la Ilustración 28, el potencial de membrana está permanente oscilando aún cuando la FBP esté en cero. Este resultado coincide con la idea de que la ruta metabólica de la glucólisis no controla la actividad eléctrica, como se ha propuesto en otros trabajos (Gylfe & Gilon, 2014). Este análisis se presentó en el "International Conference on Mathematical Methods and Models in Biosciences and the School for Young Scientists BIOMATH 2016" bajo el título "A Model Based Analysis of Glycolytic Oscillations and Electrical Activity in Pancreatic α -cells".

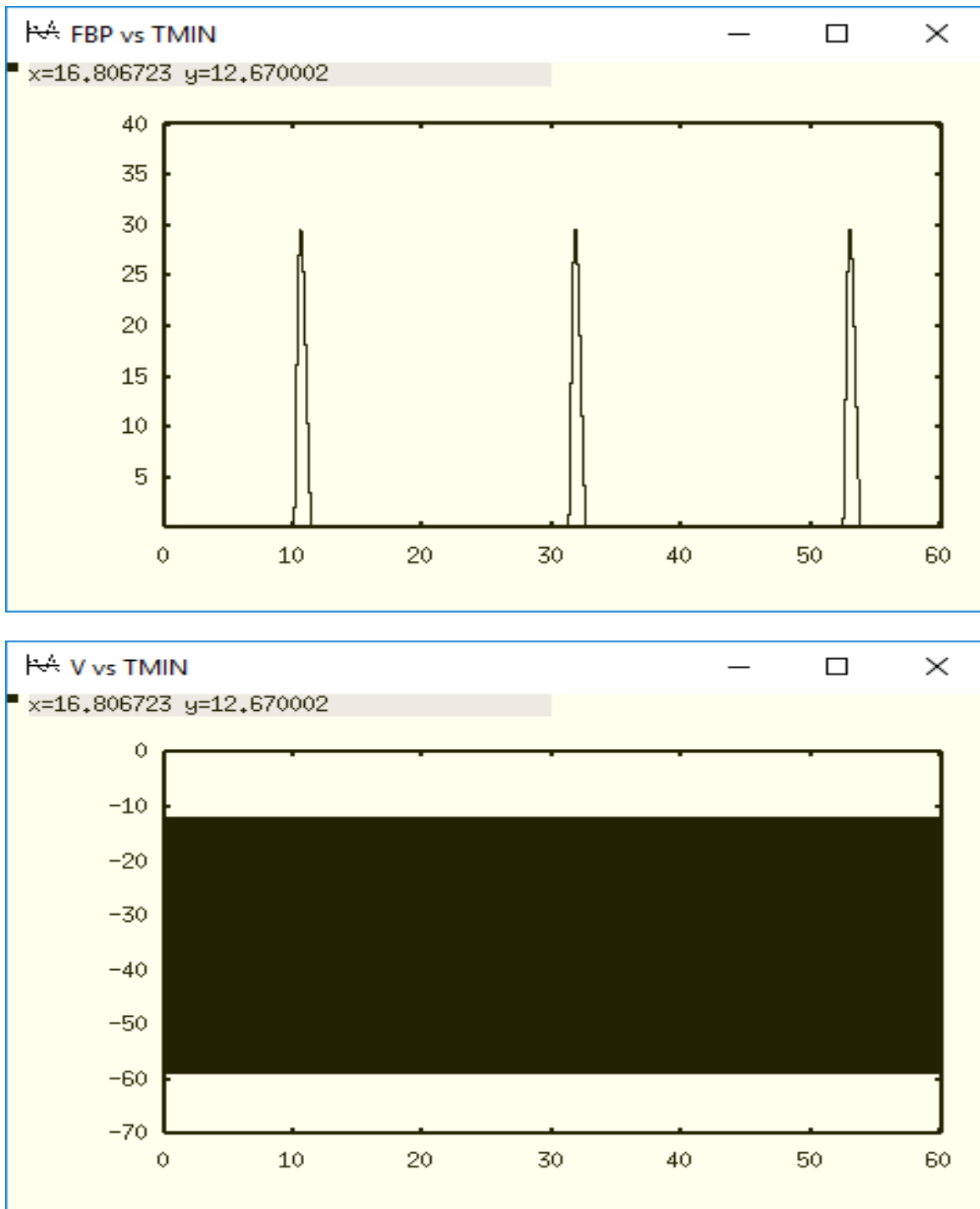


Ilustración 28. Simulación de la fructosa bifosfato (FBP, arriba), representativa de las oscilaciones glicolíticas en el modelo de célula beta propuesto por (Bertram,2004), y del potencial de membrana (V, abajo). Esta simulación se obtuvo modificando algunos parámetros del modelo original para representar una célula alfa ($R_{GK}=0.0352\text{s}^{-1}$, $g_{KATP}=200\text{pS}$, $C_m=3.5\text{pF}$).

4. Conclusiones

La célula alfa es un sistema interesante ya que el acople entre el estímulo y la respuesta permanece aún sin entenderse en su totalidad. En particular, no es claro el papel que juegan el ATP y los canales K_{ATP} en la generación de la actividad eléctrica, así como el mecanismo que controla las oscilaciones de Ca^{2+} . El enfoque de este trabajo fue el análisis de un proceso complejo en el que se considera un sistema biológico autoregulado, para lo cual se utilizaron herramientas matemáticas y computacionales.

A lo largo de este trabajo se observó que la célula alfa, como otros sistemas, es altamente sensible a los valores de los parámetros y que dependiendo de estos valores el comportamiento del sistema puede responder de diferentes maneras. Para analizarlos utilizamos los diagramas de bifurcación, los cuales nos permitieron observar de manera gráfica cuáles parámetros cambian el estado y solución del sistema. El diagrama de bifurcación ha sido de gran ayuda para entender en mayor medida el comportamiento global del sistema y nos permitió tomar mejores decisiones para encaminar las simulaciones hacia nuevos resultados. Por otro lado, se ha tenido gran aprendizaje teórico y de simulación al utilizar los softwares de MATLAB, Mathematica y XPPAUT, siendo este último indispensable para el estudio de la bifurcación.

La hipótesis que dio origen a esta tesis, que pretendía relacionar el comportamiento oscilatorio del Ca^{2+} intracelular observado en células alfa de páncreas estimuladas con baja glucosa, utilizando un modelo matemático que considere el mecanismo regulatorio del ATP y la actividad eléctrica, fue verificada. Como se ha mostrado en los resultados fue posible relacionar en el tiempo los cambios en ATP y en la conductancia de canales ATP con las oscilaciones de Ca^{2+} . Por otro lado, los resultados obtenidos con el modelo propuesto apuntan a que la presencia de oscilaciones de Ca^{2+} favorece el consumo de ATP y que este proceso prevalece sobre el de producción de ATP en la célula alfa en condiciones estimuladas. La forma como la célula balancea estos procesos dinámicos es un aspecto sumamente interesante que queda abierto para un estudio posterior.

5. Bibliografía

Bergsten, P., 2014. *Islet functions in childhood obesity and type 2 diabetes mellitus*, s.l.: UPPSALA Universitet. Department of Medical Cell Biology.

Bertram, R. y otros, 2004. Calcium and Glycolysis Mediate Multiple Bursting Modes in Pancreatic Islets. *Biophysical Journal*, November, 87(5), pp. 3074-3087.

Chay, T. R. & Keizer, J., 1983. Minimal Model for Membrane Oscillations in the Pancreatic Beta-Cell. *Biophysical Journal*, Volumen 42, pp. 181-190.

Diderichsen, P. M. & Göpel, S. O., 2006. Modelling the Electrical Activity of Pancreatic alpha-cells Based on Experimental Data from Intact Mouse Islets. *Journal of Biological Physics*, Volumen 32, pp. 209-229.

Dupont, G., Combettes, L., Bird, G. S. & Putney, J. W., 2011. Calcium Oscillations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, pp. 1-18.

Dupont, G., Combettes, L. & Leybaert, L., 2007. Calcium Dynamics: Spatio-Temporal Organization from the Subcellular to the Organ-Level. *International Review of Cytology*, Volumen 261, pp. 193-245.

Dupont, G. & Goldbeter, A., 1993. One-pool model for Ca^{2+} oscillations involving Ca^{2+} and inositol 1,4,5-triphosphate as co-agonists for Ca^{2+} release. *Cell Calcium*, Volumen 14, pp. 311-322.

Fridlyand, L. E. & Philipson, L. H., 2012. A computational systems analysis of factors regulating alpha cell glucagon secretion. *Islets*, 4(4), pp. 262-283.

Goldbeter, A., 1996. *Biochemical oscillations and cellular rhythms*. Primera ed. Cambridge: Cambridge University Press.

González-Velez, V., Gil-Gomez, A., Quesada-Moll, I., 2010. Minimal state models for ionic channels involved in glucagon secretion, *Mathematical Biosciences and Engineering*, Volumen 7, pp. 193-807.

González-Velez, V. y otros, 2012. Model for Glucagon Secretion by Pancreatic Alpha-Cells. *PLOS One*, 7(3), pp. 1-11.

Gonze, D. & Kaufman, M., 2015. *Theory of non-linear dynamical systems (Teaching Notes)*, s.l.: s.n.

Gromada, J. y otros, 1997. Adrenaline Stimulates Glucagon Secretion in Pancreatic A-Cells by Increasing the Ca^{2+} Current and the Number of Granules Close to the L-Type Ca^{2+} Channels. *The Journal of General Physiology*, Volumen 110, pp. 217-228.

Gromada, J., Franklin, I. & Wollheim, C. B., 2007. alpha-cells of the Endocrine Pancreas: 35 years of Research but the Enigma Remains. *Endocrine Reviews*, 28(1), pp. 84-116.

- Gylfe, E. & Gilon, P., 2014. Glucose regulation of glucagon secretion. *Diabetes Research and Clinical Practice*, Volumen 103, pp. 1-10.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F., 1952. A Quantitative Description of Membrane Current and its Application to Conduction and Excitation in Nerve. *The Journal of Physiology*, Volumen 117, pp. 500-544.
- Keener, J. & Sneyd, J., 2009. *Mathematical Physiology. Systems Physiology*. s.l.:Springer Science.
- Kummer, U. y otros, 2005. Transition from Stochastic to Deterministic Behavior in Calcium Oscillations. *Biophysical Journal*, 89(3), pp. 1603-1611.
- Kummer, U. y otros, 2000. Switching from simple to complex oscillations in calcium signaling. *Biophysical Journal*, Volumen 79, pp. 1188-1195.
- Li, J., 2014. *ATP Dynamics in Pancreatic Alpha- and Beta-cells (PhD Thesis)*, s.l.: Acta Universitatis Upsaliensis UPPSALA.
- Li, J., et al., 2015. Submembrane ATP and Ca^{2+} kinetics in α -cells: unexpected signaling for glucagon secretion. *The FASEB Journal*, Volumen 29, pp.3379-3388.
- MacDonald, P. E. & Rorsman, P., 2006. Oscillations, Intercellular Coupling, and Insulin Secretion in Pancreatic beta cells. *PLOS Biology*, 4(2), pp. 167-171.
- McKenna, J.P. et al., 2016. Ca^{2+} effects on ATP production and consumption have regulatory effects on oscillatory islet activity. *Biophysical Journal*, Volumen 110, pp. 733-742.
- Quesada, I., Tudurí, E., Ripoll, C. & Nadal, A., 2008. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *Journal of Endocrinology*, Volumen 199, pp. 5-19.
- Quoix, N. y otros, 2009. Glucose and pharmacological modulators of ATP-sensitive K^+ channels control $[\text{Ca}^{2+}]_c$ by different mechanisms in isolated mouse alpha-cells.. *Diabetes*, Volumen 58, pp. 412-421.
- Rorsman, P., Ramracheya, R., Rorsman, N. J. G. & Quan, Z., 2014. ATP-regulated potassium channels and voltage-gated calcium channels in pancreatic alpha and beta cells: similar functions but reciprocal effects on secretion. *Diabetología*, Volumen 57, pp. 1749-1761.
- Schwaller, B., 2012. Chapter 1. The Regulation of a Cell's Ca^{2+} Signaling Toolkit: Tge Ca^{2+} Homeostasome. En: S. Islam, ed. *Calcium Signaling Advances in Experimental Medicine and Biology*. Londres: Springer, pp. 1-25.
- Selkov, E. E., 1968. Self-Oscillations in Glycolysis 1. A Simple Kinetic Model. *European Journal of Biochemistry*, 4(1), pp. 79-86.

Sherman, A., 2010. Lessons from models of pancreatic beta cells for engineering glucose-sensing cells. *Mathematical Biosciences*, Volumen 227, pp. 12-19.

Spigelman, A., Dai, X. & MacDonald, P., 2010. Voltage-dependent K^+ channels are positive regulators of alpha cell action potential generation and glucagon secretion in mice and humans. *Diabetologia*, Volumen 53, pp. 1917-1926.

Ureña-Bogarín, E. L. y otros, 2015. Prevalence of pre-diabetes in young mexican adults in primary health care. *Family practice*, 32(2), pp. 159-164.

Wang, Z. & Thurmond, D. C., 2009. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis- roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *Journal of Cell Science*, Volumen 122, pp. 893-903.

Watts, M. & Sherman, A., 2014. Modeling the Pancreatic Alpha-Cell: Dual Mechanisms of Glucose Suppression of Glucagon Secretion. *Biophysical Journal*, 106(3), pp. 741-751.

Whitfield, J. F. & Chakravarthy, B., 2001. *CALCIUM The Grand-Master Cell Signaler*. Primera ed. Ottawa, Ontario: NRC.

Wolkenhauer, O., 2014. Why model?. *Frontiers in physiology*, 5(21), pp. 1-5.